

## 特許協力条約

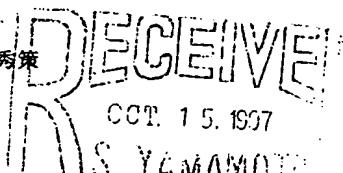
発信人 日本国特許庁(国際調査機関)

出願人代理人

山本 秀策

あて名

〒 540

大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号  
クリスタルタワー15階

殿

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書(法施行規則第41条)  
〔PCT規則44.1〕発送日  
(日.月.年)

14.10.97

出願人又は代理人

の書類記号 KA016PCT

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP97/01647

国際出願日

(日.月.年) 15.05.97

出願人(氏名又は名称)

鐘淵化学工業株式会社

1.  国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる(PCT規則46参照)。

いつ補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. : (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2.  国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項(PCT17条(2)(a))の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3.  法施行規則第44条(PCT規則40.2)に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続: 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで(官庁によってはもっと遅く)国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかつたすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国際段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特許庁長官	2J	9507
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合は、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続きにおいても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT28条（又はPCT41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正是国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仮語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仮語の場合、書簡は仮語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

## 様式PCT/ISA/220の備考（続き）

次に、添付する書簡中の、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合]：  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合]：  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合]：  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合]：  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

### “PCT19条(1)の規定に基づく説明書”（PCT規則46.4）

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる（明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない）。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならず、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性について、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関するのみ行うことができる。

### 国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書を国際事務局に提出すると同時にその写しを国際予備審査機関にも提出することが望ましい（PCT規則62.2(a)の第1文を参照）。

### 国内段階に移行するための国際出願の翻訳について

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁／選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁／選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

## 特許協力条約

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 K A 0 1 6 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/01647	国際出願日 (日.月.年) 15.05.97	優先日 (日.月.年) 17.07.96
出願人 (氏名又は名称) 鐘淵化学工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1.  請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。
2.  発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。
3.  この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
  - この国際出願と共に提出されたもの
  - 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
    - しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
    - この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は  出願人が提出したものを承認する。
  - 次に示すように国際調査機関が作成した。

---

5. 要約は  出願人が提出したものを承認する。
  - 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
第    図とする。  出願人が示したとおりである。  なし
  - 出願人は図を示さなかった。
  - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>6</sup> G 01 N 33/564

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> G 01 N 33/564

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Arthritis & Rheumatism 37 (1). 1994. Ayer L M; Rubin R L; Dixon G H; Fritzler M J [Antibodies to HMG proteins in patients with drug-induced autoimmunity] p. 98-103	1-9
A	Journal of Chromatography 530 . 1990. Yoshifumi Adachi; Shigeki Mizuno; Michiteru Yoshida [Efficient large-scale purification of non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG 2 by using Polybuffer-exchanger PBE94] p. 39-46	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.09.97

国際調査報告の発送日

14.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

2 J 9507

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Biochemistry 95. 1984. Michiteru Yoshida;Kensuke Shimura「Unwinding of DNA by Nonhistone Chromosomal Protein HMG(1+2) from Pig Thymus as Determined with Endonuclease」p. 117-124	1-9

## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

### 国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

#### [申込方法]

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。
  - 特許・実用新案及び意匠の種類
  - 出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)
  - 必要部数
- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。
  - 国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

#### [申込み及び照会先]

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル  
財団法人 日本特許情報機構 サービス課  
TEL 03-3503-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01647

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> G01N33/564

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> G01N33/564

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1996
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Arthritis & Rheumatism 37 (1). 1994. Ayer L.M.; Rubin R.L.; Dixon G.H.; Fritzler M.J. "Antibodies to HMG proteins in patients with drug-induced autoimmunity" p. 98-103	1 - 9
A	Journal of Chromatography 530. 1990. Yoshifumi Adachi; Shigeki Mizuno; Michiteru Yoshida "Efficient large-scale purification of non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG 2 by using Polybuffer-exchanger PBE94" p. 39-46	1 - 9
A	Journal of Biochemistry 95. 1984. Michiteru Yoshida; Kensuke Shimura "Unwinding of DNA by Nonhistone Chromosomal Protein HMG(1+2) from Pig Thymus as Determined with Endonuclease" p. 117-124	1 - 9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 16, 1997 (16. 09. 97)

Date of mailing of the international search report

October 14, 1997 (14. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office  
Facsimile N .

Authorized officer

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 G01N 33/564	A1	(11) 国際公開番号 WO98/02744	
		(43) 国際公開日 1998年1月22日 (22.01.98)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01647		田中真生(TANAKA, Masao)[JP/JP]	
(22) 国際出願日 1997年5月15日 (15.05.97)		〒606 京都府京都市左京区一乗寺塚本町35番地 Kyoto, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平8/187945 特願平8/266431	1996年7月17日 (17.07.96) 1996年10月7日 (07.10.96)	JP JP	中尾一和(NAKAO, Kazuwa)[JP/JP] 〒610-11 京都府京都市西京区大枝北脇掛町4-1-2 Kyoto, (JP) 吉田充輝(YOSHIDA, Michiteru)[JP/JP] 〒270-01 千葉県流山市西初石3-472-21 Chiba, (JP) 白川 仁(SHIRAKAWA, Hitoshi)[JP/JP] 〒351 埼玉県朝霞市西弁財1-14-2-505 Saitama, (JP) 小坂田史雄(OSAKADA, Fumio)[JP/JP] 〒670 兵庫県姫路市日出町2-19-2 朝日プラザ姫路東305 Hyogo, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘淵化学工業株式会社(KANEKA CORPORATION)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者; および		(74) 代理人 弁理士 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku)	
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 尾崎承一(OZAKI, Shoichi)[JP/JP] 〒615 京都府京都市右京区西院月双町111-116 Kyoto, (JP)		〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階 Osaka, (JP)	
傍島淳子(SOBAJIMA, Junko)[JP/JP] 〒573 大阪府枚方市伊加賀西町79-40-506 Osaka, (JP)			
上林裕子(UESUGI, Hiroko)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区松ヶ崎修理式町1 うるしの館小兵衛2-C Kyoto, (JP)			
岡崎貴裕(OKAZAKI, Takahiro)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区岩倉下在地町211-2 ベルヴェ宝ヶ池105号 Kyoto, (JP)			
		(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
		添付公開書類 国際調査報告書	

## (54) Title: DIAGNOSTIC DRUGS FOR AUTOIMMUNE DISEASES

(54) 発明の名称 自己免疫疾患の診断薬

## (57) Abstract

Diagnostic drugs containing at least one substance selected from among polypeptides selected from the HMG-1 family, polypeptides selected from the HMG-2 family and fragments thereof capable of reacting with antibodies of patients with autoimmune diseases; diagnostic kits; and a method for detecting antibodies of patients with autoimmune diseases with the use of the same.

## (57) 要約

HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する診断薬、診断キット、およびこれらを用いて自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法が提供される。

### 参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルガリア・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴー	IT	イタリア	NE	ニジエール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴィエトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スードン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

## 明細書

### 自己免疫疾患の診断薬

#### 技術分野

5 本願発明は自己免疫疾患患者の抗体が反応するhigh mobility group protein-1 (HMG-1)、high mobility group protein-2 (HMG-2)、あるいはそれらのポリペプチドの断片を用いる自己免疫疾患の診断薬あるいは診断のためのキット、および自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法に関するものである。特に、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、  
10 強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、および自己免疫性肝炎患者の抗体が反応するHMG-1、HMG-2、あるいはそれらのポリペプチドの断片を用いる慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、  
15 および自己免疫性肝炎の診断薬あるいは診断のためのキット、および当該患者の抗体を検出する方法に関するものである。

#### 背景技術

自己免疫性疾患や炎症性の疾患には種々の抗好中球細胞質抗体 (ANCA) が存在することが報告されている。ANCAは間接蛍光抗体法 (IIF) により検出された自己抗体であり、その染色パターンによりサイトプラスミック-ANCA (cANCA) とペリヌクレア-ANCA (pANCA) に区別される。cANCAはWegener肉芽腫症に80%という高頻度で検出され、その抗原は90%以上がプロテイナーゼ-3 (proteinase-3:PR-3) である。他方、pANCAは顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyarteritis)、pauci-immune型壊死性半月体形成性腎炎 (necrotizing crescentic glomerulonephritis、NCGN) に80%の高頻度で検出され、その抗原は80%がミエロパーオキシダーゼ (myero

peroxidase : MPO-ANCA)である。このように疾患特異性の高い抗体の測定により血管炎症候群の早期診断や鑑別診断が可能となっている。

最近、潰瘍性大腸炎(UC)等の慢性炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, IBD)、慢性関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、自己免疫性肝炎(AIH)、悪性腫瘍、アメーバ膿瘍、スヴィート病等の炎症性の諸疾患の患者にpANCAが認められている。pANCAの抗原としてラクトフェリン、カテプシンG、エラスター、リゾチーム等が同定され、病因や病態との関連が研究されているが、これら抗原のpANCAに対する特異性は低く、他の抗原が存在することが示唆されている。

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)においては間接蛍光抗体法でこれらの抗好中球細胞質抗体(ANCA)が検出される割合(陽性率)はそれぞれ、40~87%および6~27%とされている。その染色パターンは潰瘍性大腸炎ではpANCAが80~95%を占めるのに対して、クローン病ではpANCAおよびcANCAが均等に検出されている。他方で、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群ではpANCAが多く、それぞれ33%(4%)、43%(2%)、50%(8%)である(括弧内はcANCA陽性率)。

潰瘍性大腸炎およびクローン病で検出されるANCAに対応する抗原としてはラクトフェリン(Lactoferrin)、カテプシンG(cathepsinG)、ミエロパーオキシダーゼ(myeloperoxidase)およびミエロパーオキシダーゼ+エラスター、ミエロパーオキシダーゼ+エラスター+カテプシンG等種々の報告がされているが、これらの疾患に特異的に対応する抗原は未だ決定されていないのが現状である。他のpANCA陽性疾患に対応する抗原も同様に同定されていない。

潰瘍性大腸炎やクローン病の臨床上の標準的な診断には、内視鏡検査、バイオプシー、X線検査がある。これらの検査は患者にとっては、費用が高く、苦痛を伴い、また拘束される時間が長いという欠点がある。他方で、最近になって潰瘍性大腸炎の血清学的診断として間接蛍光抗体法によるpANCAの検出が報告されて

5

いる。しかし、この方法は、感度が高くないうえ、バックグラウンドが高くなる傾向にある、さらに、好中球あるいは他の細胞をプレートにエタノールで固定化して用いるため細胞の状態や固定化技術により結果が信頼できないという欠点を有しており、まだ一般には利用されていない。クローン病については自己抗体も見つかっていない。以上のように、患者血清を用いる特異的で簡便な自己免疫性疾患の診断方法が開発されていないのが現状である。

10

慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデスではリウマチ因子あるいは抗核抗体のような種々の自己抗体が產生されるが、強皮症、多発性筋炎、ペーチェット病、結節性動脈周囲炎などでは検出される自己抗体が少なく、その診断には臨床症状が主体を占めることとなる。これらの疾患では、早期の段階で疾患を診断し、十分な治療を施して成熟疾患に進行させないように努めることが予後に重要であると指摘されるようになっているが、早期診断において血清学的に簡便な診断法は開発されていない。

15

20

一般的に、自己免疫疾患が疑われるときには、抗核抗体の検査が一次スクリーニングにおける診断法として利用されている。抗核抗体は細胞核の核酸や種々の核蛋白成分を抗原とする自己抗体の総称であり、その種類は多彩である。抗核抗体の検出方法としては間接蛍光抗体法が主に用いられている。抗核抗体としては、核の染まる型により、抗DNA抗体、抗ヒストン抗体、抗ENA抗体、抗セントロメア抗体、抗核小体抗体などが推測される。しかしながら、間接蛍光抗体法による抗核抗体の測定は、精度を一定にするのに多くの問題があることが指摘されている。例えば、核材(細胞)が施設により異なる、検量線が引けない、自己抗体が不均一であるなどが挙げられるが、最も大きな欠点は、この検査法が肉眼的観察によつて判定されるものであるため、判定基準および判定技術が非客観的であることである。

25

しかしながら、この間接蛍光抗体法による抗核抗体の測定はこうした欠点を持ちながらも全身性エリテマトーデスを中心とした各種膠原病の診断や臨床像を把握する上で不可欠のものとなっている。他方で、上記した理由から抗核抗体に変

わる自己抗体(自己抗原)を同定し、それを用いる簡便で施設間格差のない客観性のある自己免疫疾患の一次スクリーニング法が望まれていることも事実である。

従って、自己免疫疾患患者の自己抗原を特定し、その自己抗原を用いて自己抗体を検出することは、自己免疫疾患であるとの診断の確定および適切な治療方針の確立に道を開くものである。そこで自己免疫疾患に出現する共通の自己抗原を同定および単離すること、およびこの抗原を用いる簡便な抗体の検出方法の開発が望まれている。

#### 発明の開示

10 本願発明者らは、上記の従来の問題点を克服するため銳意研究を重ねた結果、自己免疫疾患、特にpANCA陽性の潰瘍性大腸炎患者血清中の抗体を用いて、この抗体が反応する新規な抗原として既知の蛋白質であるhigh mobility group protein-1 (HMG-1) およびhigh mobility group protein-2 (HMG-2) を単離同定することに初めて成功した(Sobajima J. ら Clin. Exp. Immunol. 105:120-124, 1996, Sobajima J. ら Clin. Exp. Immunol. 107:135-140, 1997)。このHMG-1およびHMG-2を用いたELISA系を構築することにより、この抗原に対して、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ペーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、頭微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、および自己免疫性肝炎患者の抗体は陽性率が高いことを示し、さらに、このELISA系が間接蛍光抗体法による抗核抗体の測定法と比較して相対的に感度が高く、簡便で信頼性および客観性のあることを示すことにより、当該抗原に対する抗体の検出が慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ペーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、頭微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、自己免疫性肝炎患者などの診断用のマーカーになりうることを見いだし、本願発明を完成させるに至った。

HMG抗原は、今までにANCAの抗原としてではなく自己免疫疾患で抗核抗体の一

つとして測定されている。Dennis J. S. らは全身性エリテマトーデス患者で抗HMG-1抗体が10.3%、抗HMG-2抗体が6.9%であり、混合性結合組織病、慢性関節リウマチでは両抗体とも0%と報告している(Science 215, 1245-1247, 1982)。さらに、Briolay J. らは、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、および強皮症でイムノプロット法により抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を検出した結果、両抗体とも診断的価値はないと報告している(Autoimmunity 2, 165-176, 1989)。HMG抗原の純度、ELISA法、イムノプロット法等の手法、測定した患者の状態や検体数などに問題があると思われるが、この時点ではHMG-1およびHMG-2を用いた診断薬の発明は完成していない。しかし、抗HMG-1抗体、抗HMG-2抗体陽性例としては、抗核抗体陽性の若年性リウマチ患者の39%が抗HMG-1抗体および/または抗HMG-2抗体陽性という報告がある(Wittemann Bら、Arthritis and Rheumatism 33, 1378-1383, 1990)。本願発明では高純度なHMG-1およびHMG-2を用いELISA系を構築し、各種疾患で陽性率を測定したところ、上記10疾患で健常人と比較して統計的に有意な差を認めたことにより、本願発明を完成させるに至った。

本願発明は、HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患の診断薬、これらの疾患を診断するためのキット、および自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法に関する。ここで、上記ポリペプチドが好中球28kDa抗原(HMG-2)であるときは上記自己免疫疾患は潰瘍性大腸炎ではない。

好適な実施態様においては、上記自己免疫疾患は、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病または自己免疫性肝炎である。

好適な実施態様においては、上記ポリペプチドは、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、またはラットのHMG-1またはHMG-2から選択される。

のことにより、本願発明の目的が達成される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、健常人末梢血から分離した好中球細胞質ライゼート（抗原）をSDS-PAGEで泳動後、潰瘍性大腸炎患者5人の患者血清と健常人3人の血清から得られた精製IgG（抗体）を用いてウェスタンプロッティングしたときの結果を示す。

図2は、好中球とHL-60の細胞ライゼートを抗原とし、28kDa抗原陽性患者の血清をプローブとしたウェスタンプロッティングを行った結果を示す。

図3は、HL-60細胞からの抗原を単離する工程におけるHPLCのパターンを示す。No. 9のピークに28kDa抗原および29kDa抗原が含まれる。

図4は、HL-60細胞からの抗原を単離する工程における、HPLCのパターンを示す。No. 5のピークに28kDa抗原がNo. 6のピークに29kDa抗原が含まれる。

図5は、精製28kDa抗原（レーン2）、および精製29kDa抗原（レーン3）のウェスタンプロッティングのパターンを示す。

図6は、HMG-1およびHMG-2による患者抗体の吸収試験を示す。図示されるように、ポジティブコントロールではバンドが検出される（1、3）が、抗体が吸収されるとバンド（2、4）が消失した。

図7は、ヒト胸腺組織より調製したHMG-1およびHMG-2の混合物、ブタ胸腺組織から調製したHMG-1およびHMG-2、そして市販のウシHMG-1およびHMG-2の混合物のウェスタンプロッティングの結果を示す。図示されるように、ヒト、ブタ、ウシのHMG抗原全てが難治性潰瘍性大腸炎患者血清と反応した。この実施例のみSDS-PAGEのポリアクリルアミドは15%を用いた。

図8は、ブタ胸腺からの、HMG-1およびHMG-2の精製を示す。

図9は、潰瘍性大腸炎患者5人と健常人3人の、ウシHMG-1およびウシHMG-2混合物を抗原としてウェスタンプロッティングを行った結果を示す。

図10は、潰瘍性大腸炎患者5人と健常人3人の、ブタHMG-1およびブタHMG-2混合物を抗原としてウェスタンプロッティングを行った結果を示す。

図11は、陽性患者の血清を用いて、ELISA法により測定した用量依存曲線を示す。

図12は、ELISA法による抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定結果を示す。ブタHMG-1（図12-1）、HMG-2（図12-2）およびヒトHMG-1およびヒトHMG-2混合物（図12-3）において、用量依存的な直線が得られた。

図13は、ブタHMG-1を抗原に用いたときの各疾患別の散布を示す。

図14は、ブタHMG-2を抗原に用いたときの各疾患別の散布を示す。

図15は、ヒト、ブタ、ウシおよびラットHMG-1のアミノ酸配列の比較を示す。

図16は、ヒト、ブタ、ウシおよびラットHMG-2のアミノ酸配列を比較を示す。

10

#### 発明を実施するための最良の形態

HMG (high mobility group protein) はクロマチン構造に含まれる大量の非ヒストン蛋白質として1964年に発見され、すべての高等動植物に普遍的に含まれるタンパク質である。また、核内だけでなく細胞質内にも豊富に存在することがわかっている。生理作用ははっきりとわかっていないが、HMGはDNAと結合するが、DNAとの結合の際には塩基配列に特異的でないが二重らせん構造を緩めることから、転写反応の際、DNAの高次構造を最適構造に変化させて転写活性を高めるという、きわめて広範囲の転写促進因子およびヌクレオソーム弛緩因子として機能すると考えられている。HMGには、いくつかの種類が存在する。

20 本願発明に用いられるポリペプチドは、HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片から選ばれる。

HMG-1 (high mobility group protein-1) ファミリーとは、配列番号1に示されるヒトHMG-1と90%あるいはそれ以上のアミノ酸相同性を有するポリペプチドをいい、例えば、ウシHMG-1（配列番号3）、ブタ（配列番号4）、ラット（配列番号5）などのHMG-1を含む。好ましくはヒトHMG-1であるが、ホモロジーの高さから、ブタ、ウシ、ラットが使用できる。これらのHMG-1のアミノ酸配列

の比較を図15示す。

他方、HMG-2 (high mobility group protein-2) ファミリーとは、配列番号2に示されるヒトHMG-2と80%あるいはそれ以上のアミノ酸相同性を有するポリペプチドをいい、ブタHMG-2 (配列番号6)、ウシHMG-2の部分配列 (配列番号7)、ラットHMG-2 (配列番号8)、チキンHMG-2 (配列番号9)、チキンHMG-2a (配列番号10)、マウスHMG-2 (配列番号11)などのHMG-2を含む。好ましくはヒト、ブタ、ウシのHMG-2である。これらのHMG-2のアミノ酸配列の比較を図16に示す。

HMG-1あるいはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドには、アミノ酸が一つまたはそれ以上、欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドあるいは、それらの断片であって、自己免疫疾患者の抗体と反応し得るポリペプチドも含まれる。

これらの断片とは、HMG-1ファミリーまたはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドの断片のうち、自己免疫疾患者の抗体と反応し得る断片をいう。断片は、化学的に合成されたり、あるいは適当な蛋白分解酵素を用いて作製され得る。作製された断片が抗体と反応するか否かは、自己免疫疾患者から得られた血清と反応させることにより、決定し得る。この方法は当業者には周知であり、下記の抗体の検出方法と同じ手法が用いられ得る。

HMG-1およびHMG-2は、あらゆる細胞が持っている普遍的な蛋白質であるためいかなる臓器、組織、細胞からでも抽出することにより調製され得る。例えばヒト胸腺、ブタ胸腺、ウシ胸腺、ヒト胎盤、好中球、HL-60細胞株等である。抽出および精製方法は公知であり、例えば、M. YoshidaおよびK. Shimura (J. Biochem. Tokyo, 95, 117-124, 1980) や、Y. Adachiら (J. Chromatogr, 530, 39-46, 1992) の方法により調製され得る。また、ウシのHMG-1およびHMG-2混合物が和光純薬社より販売されている。

上記のHMG-1ファミリーまたはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドは、それ

を生産する上記組織や培養細胞より、あるいはそのポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞に導入して発現させることにより、生産され得る。アミノ酸が一またはそれ以上、欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドは、例えば、HMG-1またはHMG-2の遺伝子配列をもとに、周知の方法、例えば、部位特異的突然変異、M13ファージを用いる欠失突然変異などの方法で遺伝子配列を改変して、これを発現させることにより生産され得る。宿主細胞としては、原核生物、真核生物のいづれもが用いられ得る。例えば、大腸菌、バシラスなどの細菌、酵母、カビ、昆虫細胞、哺乳動物細胞などが挙げられる。ポリペプチドの精製には、公知の方法、例えば、ゲルfiltrationクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーが、単独あるいは組み合わせて、用いられ得る。好適には逆相HPLCやイオン交換クロマトグラフィーが用いられ得る。逆相HPLC用カラムとしては、市販の種々のカラムが用いられ得るが、好適には蛋白質分離用カラム、例えば、YMC-プロテインRPカラム(ワイエムシー社製)が用いられ得る。またイオン交換クロマトグラフィーとしては、例えばpolybuffer-exchanger PBE94カラムクロマトグラフィー、あるいはmonoQカラム(ファルマシア社製)等が用いられ得る。

本願発明においては、自己免疫疾患として、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ペーチェット病、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、および自己免疫性肝炎が挙げられる。

本願発明でいう潰瘍性大腸炎とは、以下の症状を有するものをいう。まず、潰瘍性大腸炎とは、主として粘膜と粘膜下層を侵す、大腸、特に直腸の特発性、非特異性の炎症性疾患をいう。この疾患は、30歳以下の成人に多いが、小児や50歳以上のものにも見られる。原因は不明で、免疫的機序や遺伝因子、心理学的要因の関与が考えられている。通常血便下痢と種々の全身症状を示す。長期にわたり、

かつ大腸全体をおかす場合には悪性化の傾向がある。難治性の潰瘍性大腸炎とは、上記潰瘍性大腸炎が、厳密な内科的治療下にありながら、①慢性持続性、②再燃後の6ヶ月間以上なお活動期にある、③頻回に再燃を繰り返す、のいずれかの条件を満たす症例をいう。

5 クローン病は、小腸や大腸を含む全消化管におこる可能性のある原因不明の炎症性腸疾患である。非連続性あるいは区域性病変、縦走潰瘍、全層性炎症性病変(腫瘍または狭窄)、非乾酪性肉芽腫などを特徴とし、若年(15~24歳)の発症が多い。自己抗体は発見されておらず簡便な血清学的診断法はない。

10 慢性関節リウマチ(RA)は原因不明の慢性進行性の難病である。RAの本態は、自然治癒傾向を示さない慢性滑膜炎にあり、リンパ球の浸潤、血管新生、滑膜細胞の重層化とともに滑膜細胞の増殖が見られる。手足の小関節および膝、肘、肩、股関節などの大関節が対称性におかされる。そしてこのような関節における滑膜炎症の持続と炎症組織の増殖が、やがて軟骨や骨を破壊する結果、関節変形や身体障害がもたらされる。

15 全身性エリテマトーデスは多臓器疾患であり様々な疾患を併発する。蝶型紅斑などの皮膚症状、口腔潰瘍、関節炎、ループス腎炎、中枢神経病変をはじめとして全身ほぼ全ての組織、臓器に非感染性の炎症病変が起こる。また、種々の自己抗体が産生されるが、疾患特異的な自己抗体は特定されていない。診断的には間接蛍光抗体法による抗核抗体の出現率がほぼ100%であるが、特異性は高くない。若年女性に圧倒的に多い疾患である。近年5年生存率は95%を越えるが、経過は長期におよび、寛解増悪を繰り返すことが多い。

20 シエーグレン症候群は、涙腺と唾液腺を主とする外分泌腺、あるいは水分分泌組織の慢性炎症性疾患であり、涙液と唾液分泌量減少による口腔および目の乾燥症候群である。多くが乾燥症候群のみであるが、一部に甲状腺、肺、胃腸、肝、腎などの障害を合併することがあり、また、約30~40%に慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデス、強皮症などを重複し、臨床的に多彩な病状を呈すること

がある。赤沈亢進、高ガンマグロブリン血症、各種の自己抗体が認められる。免疫学的検査では、自己抗体は多彩であり、リウマチ因子(80%)、抗核抗体が過半数にみられる。

強皮症(全身性硬化症)は皮膚の硬化と臓器障害をともなう結合組織病であるが、種々の病型が存在し、必ずしも全身性、進行性とは限らない。全身の広範囲の皮膚の硬化(広汎性強皮症)と食道、腸管、肺、腎臓、甲状腺等の臓器障害を合併し、進行が速い予後不良のものから、皮膚の硬化が顔面や手指に限局し、内蔵病変は徐々に出現するCREST症候群と呼ばれる予後良好のものまでさまざまである。抗核抗体の中でトポイソメラーゼ1に対する自己抗体である抗Sc1-70抗体は、広汎性の本症に特異性が高い(陽性率30%)。抗セントロメア抗体は、本症のうちCREST症候群に、また本症と多発性筋炎の重複症候群には、抗Ku抗体が診断的価値が高い。

原発性胆汁性肝硬変は中年以降の女性に好発し、皮膚搔痒感、黄疸を特徴とする慢性の疾患(症候性)であるが、これらの症状をともなわず偶然発見される無症候性もある。小葉間胆管の破壊に始まり、しだいに纖維組織が増生し、肝硬変の組織像へと進展する。これらの胆管を中心とする変化が、持続する黄疸を特徴とする臨床像に反映されている。病因については解明されていない。無症候性、症候性を問わず、約30%に自己免疫疾患(シェーグレン症候群、慢性関節リウマチなど)を合併することが知られている。

多発性筋炎(PM)は骨格筋が系統的に非化膿性炎症を起こし、筋痛と筋力低下を示す疾患である。同じPMでも眼瞼の赤紫色紅斑(ヘリオトロープ)や手指関節背面の角化性紅斑(ゴットロン徵候)をともなうものを皮膚筋炎(DM)と呼ぶ。これらは横紋筋でも近位筋を最初におかし、立ち上がりれなくなったり、手を挙げられなくなる。重症では首や頭を支えられなくなる。この疾患の一部は癌や悪性腫瘍に併発するので、その場合は癌の治療が必須、先決である

ペーチェット病は、臨床的な主症状として、口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍

(発現率99%)、皮膚症状(84%)では結節性紅斑、毛嚢炎、座瘡様皮疹、皮下の血栓性静脈炎、そして皮膚の被刺激性亢進として剃刀負けや針反応、眼症状(90%)では虹彩毛様体炎、網膜脈絡膜炎などを示す、原因不明の難治性疾患である。その他副症状に関節炎や消化器症状がある。

5 結節性多発動脈炎は動脈に系統的な炎症をみる代表的な壊死性血管炎である。この疾患は希で診断は難しいが、早期に的確な治療を要する疾患でもある。動脈炎では全身に多彩な病変が起こるが、特に重要なものは皮膚病変、腎病変、消化管病変、中枢神経病変などである。男性に多く、抗核抗体などもみられない。

10 自己免疫性肝炎(autoimmune hepatitis、以下AIH)は原発性胆汁性肝硬変(PBC)とともに代表的な自己免疫性肝炎である。PBCが胆管上皮細胞に対する自己免疫応答に対してAIHは肝細胞成分に対する自己免疫応答と考えられている。女性に好発し、高グロブリン血症、抗核抗体をはじめとする種々の自己抗体の出現、発熱、関節痛などを伴つたり膠原病を含む自己免疫疾患を合併するなどの特徴的な臨床所見を示す。自己抗体の中では、細胞核の成分と反応する抗核抗体(ANA)(約15 70~90%)と平滑筋に反応する抗平滑筋抗体(66%)が最もよくみられる。抗核抗体は必ずしもAIHに特異的とはいはず、他の自己免疫疾患、特に全身性エリテマトーデス(SLE)などでも認められる。抗平滑筋抗体は、抗核抗体とは異なり、SLEなどの自己免疫性疾患では陽性率は低く、AIHに比較的特異的である。

20 抗体とは、自己免疫疾患の体液中に存在し、ある特定の抗原性の物質により惹起される、体液に含まれる成分をいう。例えば、潰瘍性大腸炎患者の抗体、あるいは慢性関節リウマチ患者の抗体というときは、それぞれ潰瘍性大腸炎あるいは慢性関節リウマチと診断された患者の血清などの体液に含まれる体液成分をいう。自己免疫疾患の抗体としては、IgM、IgG、IgE、IgD、IgA等が挙げられる。

25 本願発明の診断薬は、上記のHMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片を含む。診断薬には、HMG-1 ファミリーのポリペプチド、HMG-2 ファミリーのポリペプチドあるいはその断片が少なく

とも一種類含まれていればよい。好適にはHMG-1 およびHMG-2 の混合物の使用である。

本願発明の診断薬は、自己免疫疾患患者の抗体と反応し、抗原抗体複合体を形成する。従って、形成した抗原抗体複合体を検出し得るさらなる成分を含有し得る。これらの成分は、たとえば、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンプロ

ッティング法等の方法に適合する成分である。

HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片は、診断キットにされ得る。診断キットは、例えば、HMG-1ファミ

リーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片

が固定化されたELISA用プレートと、自己免疫疾患患者の抗体と結合した抗原抗

体複合体を検出するための試薬とを含み得る。この試薬は、沈降反応法、ELISA

法、RIA法、ウェスタンプロッティング法等の方法に適合する成分を含む。検出

するための試薬としては、ELISA法では、例えば2次抗体試薬が挙げられる。2

次抗体試薬は、ヤギあるいはマウスの抗ヒトIgGあるいは抗ヒト(IgA+IgG+IgM)

であり、ヒトIgG、IgM、IgAと反応するものである。これら2次抗体は、一般に

免疫測定法で用いられる標識剤で標識されていればよい。そのような標識剤とし

ては、放射性同位体(例えば<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I等)、酵素(例えばβ-ガラクトシダ

ーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、

乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼなど)、

補酵素・補欠分子族(例えば、FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど)、フルオレ

セイン誘導体(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチ

オフルバミルなど)、ローダミン誘導体(例えば、テトラメチルローダミンBイソ

チオシアネートなど)、ウムベリフェロンおよび1-アニリノ-8-ナフタレンスル

ホン酸、ルミノール誘導体(例えば、ルミノール、イソルミノールなど)などが用

いられ得る。好適にはアルカリリフォスファターゼやペルオキシダーゼであり、前

者の場合基質はパラニトロフェニルリン酸であり、後者の場合はテトラメチルベ

ンジジン(TMBZ)が好適である。抗体と標識剤との結合は、成書(例えば、「続生化学実験講座5 免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、1986年発行、p102-112)に記載されているような公知の方法から適宜選択して実施し得る。また、標識2次抗体の多くは市販されており利用され得る。例えば、アルカリリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')<sub>2</sub>ポリクローナル抗体はImmunotech S. A.社(フランス)から入手し得る。

キットの形態としては、抗原が適切な容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に含まれている形態、あるいは、抗原が、容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に固定された形態などが挙げられる。

10 担体としては、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体(セファデックスなど)、アガロースゲル(セファロース、バイオゲルなど)、セルロース(ペーパーデスク、濾紙など)などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコーンなどの無機高分子化合物が例示され得る。これらは、アミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、水酸基、スルヒドリル基などの官能基が導入されたものであってもよい。好適な例として、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルが挙げられる。

20 担体の形状は、平板状(マイクロタイタープレート、ディスクなど)、粒子状(ビーズなど)、管状(試験管など)、纖維状、膜状、微粒子状(ラテックス粒子など)、カプセル状、小胞体状などいずれの形態であってもよく、測定法に応じて好適な形状の担体が適宜選択され得る。好適には、ELISA系において一度に多量の検体を処理できる96穴マイクロタイタープレートであり、例えば、EBプレート(ラボシステムズ社製)、Hタイププレート、Cタイププレート(住友ベークライト社製)、マキシソーププレート(Nunc社製)およびE. I. A. /R. I. A. プレート(コースター社製)などが例示され得る。

担体と抗原の結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法(例えば、「固定化酵素」千畠一郎編、昭和50年3月20日、(株)講談社発行を参照)が採用され得、とりわけ、物理的吸着法は簡便である点で好ましい。抗原と担体とは直接、あるいは抗原と担体との間に他の物質(スペーサー)などを介して結合され得る。固定された抗原は、ゼラチン、BSAなどのプロッキング剤で、非特異的結合を抑制するためにプロッキング処理され得る。

本願発明の自己免疫疾患の抗体を検出する方法は、HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片(抗原)と自己免疫疾患の体液成分とを反応させる工程を含む方法である。

抗原と抗体とを反応させる条件は、当業者に周知の条件が適用される。抗原抗体反応物の検出も、当業者に公知の方法が適用され得る。検出方法としては、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等が挙げられる。例えば、適当に希釈された患者血清と抗原とを反応させ、洗浄後、2次抗体であるアルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG抗体を加えて反応させ、その後、アルカリフォスファターゼ基質であるp-ニトロフェニルリン酸を加えて発色させ、405nmの吸光度を測定することにより抗HMG-1および抗HMG-2抗体が測定され得る。

キットにはHMG抗原の他に、必要により発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、サンプル前処理用試薬等の各試薬から測定法に応じた適当な試薬が適宜選択され得、本願発明のキットに添付され得る。

以下、潰瘍性大腸炎患者を例にとり、その抗体と反応する抗原をスクリーニングし、その抗原がHMG-1およびHMG-2であることを特定する方法、並びにHMG-1およびHMG-2抗原を用いたELISA系による抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を測定する方法について説明する。

まず、潰瘍性大腸炎患者から血液を採取し、血清成分を得る。次に、その血清成分について抗好中球細胞質抗体(ANCA)の存在を蛍光抗体法で測定する。他方で、健常人の末梢血より比重遠沈法により好中球画分を分離する。次に、この好中球

5

画分を処理して、好中球ライセートを得、ウェスタンプロッティングを行う。例えば、 $10^6$ 個に相当する好中球を2-メルカプトエタノールおよびSDSを含むサンプルバッファーに溶解し、10分間煮沸し、アイスコールドで急冷後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行う。泳動後、常法に従って、ナイロン膜に蛋白質のバンドを転写し、スキムミルク等を用いて非特異的結合をブロックする。

10

他方、ANCA陽性患者の血清をプロテインAカラムに通し、IgG抗体画分を精製する。この精製されたIgG抗体画分と上記ナイロン膜に転写された好中球ライセートを反応させる。ナイロン膜を洗浄後、例えば、ECLキット(アマシャム社製)などの検出剤で化学発光させ、バンドを検出し、抗原の存在が決定される。

上記の方法により、抗原性を有するポリペプチド(抗原ペプチド)が確認され得る。このような抗原ポリペプチドは、公知の蛋白質の精製方法を適用して、精製され得る。

15

あるいは、上記抗体を用いて、抗原ペプチドを生産する細胞株が特定され得る。このような細胞株を用いて抗原ペプチドを生産させ、公知の蛋白質の精製方法を適用して、精製され得る。

20

上記の方法を用いることにより、28kDaの、抗好中球細胞質抗体(ANCA)に対する抗原が特定され得た。後に実施例で示すように、ANCA陽性患者24人中10人に28/39.5/44/47/58kDaの抗原が少なくとも一つ以上が検出され、この内7人が28kDa抗原を持っており、さらに7人中5人が難治性の潰瘍性大腸炎と診断されていた。他方、間接蛍光抗体法でANCA陰性の潰瘍性大腸炎患者血清では陽性バンドは検出されなかった。なお、本願発明における抗原の分子量は、10% SDS-PAGEで決定したものという。

25

上記スクリーニング方法で、28kDa抗原を産生する細胞をスクリーニングしたところ前骨髓性白血病由来の好中球系の細胞であるHL-60細胞株(ATCC CCL-240)が28kDa抗原を持つことがわかり、さらに、ウェスタンプロッティングの結果か

ら28kDa抗原に加えて29kDa抗原が存在することが示唆された。このHL-60細胞株から、28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。28kDa抗原および29kDa抗原の精製には、公知の蛋白質の精製方法が適用され得る。例えば、HL-60細胞株を、5 %FCSを添加したRPMI1640培地で培養し、細胞を6M塩酸グアニンに溶解し、超音波処理を行うことにより蛋白分解酵素を失活させる。完全に蛋白質を溶解させ、透析、例えば限外濾過により、濃縮すると同時に溶液をPBSに置換する。この水溶液から、28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。好適には逆相HPLCが用いられ得る。アセトニトリルの濃度勾配を用いる逆相HPLCで分画することにより90%以上の純度を有する28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。アセトニトリルの濃度勾配を用いる逆相HPLCの条件は当業者には周知の条件で行われ得る。

精製された蛋白質のアミノ酸配列の解析の結果、29kDa抗原はhigh-mobility group protein-1 (HMG-1)、および28kDa抗原はhigh-mobility group protein-2 (HMG-2)と同定された。

抗体陽性患者の精製IgGをウシのHMG-1およびHMG-2で吸収した後、精製28kDa抗原および29kDa抗原との反応をウェスタンブロッティングでみたところ、反応しなかった。このことから、抗原はHMG-1およびHMG-2であることが確認された。

さらに、ヒト胸腺およびブタ胸腺よりHMG-1およびHMG-2画分を調製しウェスタンブロッティングを行ったところ患者抗体と反応することがわかった。

ヒトHMG-1のアミノ酸配列は、ブタ、ウシ、およびラットと比較して(図13)それぞれアミノ酸が2個、1個、および2個が異なるだけであるため、ヒトの代わりにこれらの動物のHMG-1をELISAの抗原として用いることが可能である。またHMG-2に関してはヒトとブタおよびラットはアミノ酸2個が異なるだけであるため(図14)、やはりヒトの代わりに用いることが可能と考えられる。ウシに関しては図14に示した様に、部分配列しか決定されていない上に報告されている配列も不確かと考えられる(ウシの配列は蛋白質データバンクPIR B61611より転載)。HMG-1およびHMG-2は種間でかなりよくアミノ酸配列が保存されている蛋白質と考

えられ、ヒトとブタの高度な類似性を考慮に入れると、ウシも2個より多く異なるとは考えられない。このことは上記した吸収実験で、患者抗体がウシのHMG-1およびHMG-2で吸収されヒトのHMG-1およびHMG-2と反応しなくなったことからも示唆される。

5 HMG-1およびHMG-2はヒト、ブタ、あるいはウシの胸腺組織から、前記の文献の方法に従って簡便に調製され得る。ヒト胸腺組織からの調製法を例に簡単に述べる。子供胸腺組織を細切片にし、0.075M NaCl/0.025M EDTA(pH7.5)に懸濁させポリトロンホモゲナイザーで細胞を破壊する。遠心によりクロマチンを含む沈澱を回収し、0.35M NaCl(pH7)に懸濁させ、ホモゲナイザー処理によりクロマチンに結合したHMGを遊離させる。遠心により不溶物を除去し、得られた上清を2%トリクロロ酢酸溶液とし4℃で2時間放置し、HMG-1およびHMG-2以外の不溶性蛋白質を沈澱させる。上清を遠心分離して回収し、アンモニア/アセトンによるアルカリアセトン沈澱を行い、沈澱してきたHMG-1およびHMG-2を遠心分離により回収する。沈澱を90%アセトンで洗浄後乾燥させた。この画分を6M塩酸グアニジンに溶解し、透析によるPBSへの置換と濃縮を行い、HMG-1およびHMG-2画分とした。このHMG-1およびHMG-2画分はウェスタンブロッティングにより潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した。

10

15

本願発明で用いたブタHMG-1およびブタHMG-2は本願発明者の一人である吉田らの方法(Y. YoshidaおよびK. Shimura, J. Biochem. Tokyo 95, 117-124, 1980、およびY. Adachiら、J. Chromatogr. 530, 39-46, 1992)により調製および精製した純度95%以上の標品を用いた。これらはヒトのHMG-1およびHMG-2同様患者血清と反応した。

20 また、市販のウシのHMG-1およびHMG-2(和光純薬社製)も、潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した。従って、HMG-1およびHMG-2は、潰瘍性大腸炎患者の抗原であると考えられる。

25 精製ブタHMG-1およびHMG-2を用いて上記の方法に従ってELISA系を構築した。

即ち、96ウェルのELISA用プレート(Nunc社製)の各ウェルに5 μg/mlのブタHMG-1あるいはHMG-2を50 μlずつ添加し、4℃で24-36時間静置した。過剰の抗原を除去後、5%BSAによるブロッキングを行う。5%BSAで適当に希釈した患者血清を加え2時間室温で静置する。洗浄液で洗浄後、アルカリリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>を加え、室温で2時間反応させる。洗浄液で5回洗浄後、パラニトロフェニルリン酸(Sigma社製)溶液(10%ジエタノールアミン溶液)を加え、室温で20-25分反応させ、405nmの吸光度を測定する。

この系を用いて、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体とも陽性の潰瘍性大腸炎患者血清を用いて標準曲線を検定したところ、両抗原とも濃度依存的な直線が得られ、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定が可能であることがわかり、このELISA系を用いて各疾患での抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体を測定できることが示唆された。

そこで、種々の自己免疫疾患である、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、自己免疫性肝炎(AIH)、C型肝炎、B型肝炎患者、及び健常人について抗HMG-1抗体及び抗HMG-2抗体を測定した。その結果、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病、AIH、B型肝炎およびC型肝炎を除く7疾患で、HMG-1の方がHMG-2より抗原性が強く陽性率が高かった。また、HMG-1については多発性筋炎/皮膚筋炎およびB肝炎以外の11疾患で健常人と比較して統計的に有意な差を示した。さらに、間接蛍光抗体法による抗核抗体陽性率と比較したところ、13疾患中8疾患で抗HMG抗体陽性率が抗核抗体陽性率と同等かそれ以上の値を示した。これにより、抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定は、間接蛍光抗体法による抗核抗体の検出に代わり得る自己免疫疾患診断法となる可能性が示された。また、抗核抗体検査との併用により、より広く確実に自己免疫疾患を診断し得ると考えられる。

pANCAの対応する抗原としてHMG-1 およびHMG-2 が同定されたが、これらはもともと核内蛋白質として同定されており、今まで抗核抗体と呼ばれていた抗体の抗原である可能性がある。従って、pANCA陽性疾患だけでなく抗核抗体陽性疾患についても抗HMG-1 およびHMG-2 抗体が検出されることが考えられる。さらには間接蛍光抗体法よりもELISA法の方が感度が高いため、今までANCA陰性あるいは陽性率が低いと考えられていた疾患にも抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体が検出される可能性がある。例えば、ウェゲネナー肉芽腫症、白血球破壊性血管炎、Churg-Strauss症候群、原発性硬化性胆管炎、混合性結合組織病、悪性腫瘍、アメバ膿瘍、スヴィート病、多発性硬化症、アルツハイマー病、橋本病、甲状腺機能亢進症、赤白血病などが挙げられる。

好中球は高度の運動能を有し、盛んな貪食能を示す。生体内で炎症が起こると最初に炎症局所に遊走してくる細胞の一つであり、炎症組織の破壊、融解を行い終局的に傷害組織の除去、吸収に向かう。自己免疫疾患における組織傷害においても好中球が局所に浸潤している例が多く、炎症の一助を担っていると考えられている。炎症が継続あるいは緩解と増悪を繰り返すことによる度々の好中球による侵出と傷害組織の貪食による濃球の形成により、好中球内部の蛋白質がT細胞やB細胞に暴露されやがて抗体が産生されていくものと考えられる。このようにして産生された抗体が抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体(主には抗HMG-1 抗体であるが)とすると、これらの抗体は自己免疫疾患の発症初期から産生されている可能性があり、抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体の測定により、早期の自己免疫疾患を診断できる可能性がある。

また、炎症の活動期には好中球だけでなく炎症局所の活性化された細胞においてもHMG抗原の産生が亢進している可能性があり、細胞の破壊に伴うHMGの遊離により抗HMG抗体の産生が増強されることが考えられる。従って、抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体の測定は、疾患活動性の指標となることが考えられる。

さらに本願発明は、ELISAにより抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体の測定を行う

キットに関するものも含むが、別法として自己免疫疾患あるいは炎症性疾患患者の末梢血リンパ球とHMG-1およびHMG-2との応答性を調べることにより、疾患特異性を検定することができる。すなわち、HMG-1およびHMG-2あるいは免疫反応性のあるそれらの合成ペプチドに応答してTリンパ球が増殖するかどうか、あるいは同じアッセイ系においてマクロファージによる $\gamma$ -インターフェロンの産生があるかどうかを測定することにより疾患を検出し得る。

また、炎症局所の好中球の破壊によりHMGが遊離してくる場合、HMGそのものを測定することにより、疾患の活動性の指標になる可能性が考えられる。HMGの測定法としては、例えばサンドイッチELISAや免疫沈降法がある。サンドイッチELISAでは、例えばモノクローナル抗HMG抗体をプレートに固定化し、精製HMGと結合させた後、患者血清と反応させ、結合した抗HMG抗体を、HRPなどで標識した抗Ig抗体で検出すればよい、また免疫沈降法の場合、HMGと患者血清を溶液中で反応させ、I<sup>125</sup>等でラベルした抗Ig抗体と反応させ沈降してくる抗原抗体反応物の放射能を計測することにより測定できる。

15

### 実施例

以下、本願発明を実施例を挙げて説明する。

(実施例1) 好中球細胞質抗体(ANCA)の間接蛍光抗体法による検出  
潰瘍性大腸炎患者35人(男16人、女19人)から末梢血を採取し、遠心分離(4℃、20分間、2000rpm)して血清成分を得た。この血清について抗好中球細胞質抗体(ANCA)の陽性率を間接蛍光抗体法で測定した。対照としてクローン病患者10人(男9人、女1人)から採取した血液を同様に処理して得た血清成分についても測定した。

エタノール固定したヒト好中球を用いた間接蛍光抗体法の測定条件を以下に記

25

載する。

まず、末梢血をフィコールパックを用いる比重遠沈法にかけて好中球を分離し、

サイトスピニにより、1スライドあたり $10^5$ 個貼付する。これをドライヤーの冷風で風乾し、PBS(0.8% NaCl/0.02% KC1/10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7.4)で洗浄する。他方で、サンプルの血清をPBSで1:10に希釈し、その20 $\mu$ lを上記プレートにのせ、湿潤室で、室温で1時間反応させる。反応終了後、PBSで洗浄する。

5 FITC標識ウサギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>抗体(Serotech社製)をPBSで1:20に希釈し、その20 $\mu$ lを上記プレートに乗せ、湿潤室で、室温で30分間反応させる。反応終了後、PBSで洗浄する。洗浄後、PBSで1:9に希釈したグリセロールで包埋し、蛍光顕微鏡で観察する。この方法で検出した結果を表1に示した。潰瘍性大腸炎患者35人中、24人がANCAを有していた(陽性率は69%:表1参照)。

10 この陽性患者24人の血清成分中の抗好中球細胞質抗体(ANCA)は、間接蛍光抗体法の染色パターンとしてはほとんどがpANCA(24人中22人がpANCA、2人がヌクレア-ANCA)であった(表1参照)。後記する表3の患者No.24および25の2人がヌクレア-ANCAであった。

表1

15 潰瘍性大腸炎患者およびクローン病患者の間接蛍光抗体法によるANCA

患者	患者数	陽性者 陽性率(%)	染色パターン			タイア-
			ペリヌクレア-	サイトプラスミック	ヌクレア-	
潰瘍性大腸炎	35	24(59)	22	0	2	1/10-1/320
クローン病	10	6(50)	2	4	0	1/10-1/40
正常	39	0(0)				

20 (実施例2) ANCAに対する既知抗原の検討

上記、潰瘍性大腸炎患者35人について、ANCAに対する抗原を検討した。

ミエロバーオキシデース(MPO)(Elastin Products社製)5 $\mu$ g/ml、カテプシンG(CaG)(INC Biochemical社製)5 $\mu$ g/ml、およびラクトフェリン(LF)(Sigma社製)10 $\mu$ g/mlを調製し、96穴のマイクロタイヤープレートにそれぞれ50 $\mu$ l/well、50 $\mu$ l/wellおよび100 $\mu$ l/well注入し、4℃で1夜、コーティングした。コーティング後、溶液を除去し、5%BSA(ウシ胎仔血清)を含むPBS(5%BSA/PBS)を加え、

30分間反応させた。ついで、5% BSA/PBSを除去し、患者から得られた血清を5% BSA/PBSを用いて10倍に希釈し、マイクロタイタープレートに加え、室温で24時間反応させた。反応液を除去し、1% BSA/PBS/0.5% Tween20で5回洗浄した。洗浄後アルカリリフォスフォターゼ(ALP)標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体(Immunotech S.A.社製)を5% BSA/PBSで1000倍に希釈して加え、室温で24時間反応させた。反応終了後、1% BSA/0.5% Tween20/PBSで5回洗浄した。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸(最終濃度5mg/ml)の10%ジエタノールアミン溶液(ジエタノールアミン50ml+蒸留水450ml)を100μl加え、室温で30分間発色させた。発色後、405nmの吸光度を測定した。

この方法で、抗MP0抗体は、全例で検出できず、間接蛍光抗体法陽性患者24人のうち、抗CaG抗体については9人が陽性であり、抗LF抗体については3人が陽性であった。他の12人は対応する抗原を特定することはできなかった(後述の表2および表3参照)。

(実施例3) 抗好中球細胞質抗体(ANCA)に対する抗原のスクリーニング  
ANCA陽性患者24人について、好中球ライセートを用いたウエスタンブロッティングをおこなった。

健常人から末梢血を採取し、フィコールパックを用いる遠心分離法で、好中球画分を調製した。1ウェルあたりPBS 8μlに好中球を10<sup>6</sup>個浮遊させ、サンプルバッファー(0.2M Tris-HCl pH6.8/10% SDS/25% 2-メルカプトエタノール/25% グリセロール/0.01% BPB)を2μl加えて直ちに10分間煮沸して抗原溶液とした。この抗原溶液を、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、常法に従い、イモビロン膜(Millipore社製)にトランスファーし、非特異的結合をブロックするために5%スキムミルク溶液を加えて2時間反応させた。他方、患者血清320μlをプロセッピA(Bio Processing社製)(10mlベッドボリューム)にかけ、0.1M-グリシン(pH3.0)を用いてIgG画分を溶出し、精製し、

IgG 20mg/mlの溶液を得た。上記調製したイモビロン膜と5%スキムミルクで8倍希釈したIgG溶液1mlとを4℃で一晩反応させた。洗浄後、ミエロパーオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories, INC社製)13μg/mlをさらに反応させ、ECLキット(アマシャム社製)で化学発光させ、バンドを検出した。結果を表2および表3に示す。

表2

患者No.	IIF	MPO	CaG	LF	28KDa抗原等	難治性
1	+	-	-	-	+	+
2	+	-	-	+	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	+	+
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	+	+
7	+	-	-	+	-	-
8	+	-	+	-	+ (39.5KDa)	+
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	+ (47KDa)	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	+	-	+	-
15	+	-	-	-	+ (44KDa)	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	+	-	+	+
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	+	-

表中+は反応性あり、また難治性であることを示す

表 3

患者No.	IIF	MPO	CaG	LF	28kDa抗原等	難治性
5	21	+	-	+	-	+
	22	+	-	-	+	-
	23	-	-	+	-	-
	24	+	-	+	-	+(50kDa)
	25	+	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-
10	28	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-
	33	-	-	-	-	-
	34	-	-	-	-	-
15	35	-	-	-	-	-

表中+は反応性あり、および難治性であることを示す

これらの結果、抗好中球細胞質抗体(ANCA)の陽性患者24人中11人の血清中に、  
20 28/39.5/44/47/50/58kDaのバンドのいずれかと結合する抗原が存在することが見  
いだされた。特に、11人中7人の血清中には、28kDaのバンドと結合する物質が  
存在することが確認された。この28kDaのバンドを有する7人中5人は難治潰瘍  
性大腸炎と診断されている患者であった(図1参照)。

他方、間接蛍光抗体法でANCAが検出されなかった(ANCA陰性)の潰瘍性大腸炎患  
25 者血清からは、28kDaと結合する抗体は検出されなかった。また、対照としたク  
ローン病患者血清では28kDaと結合する抗体は検出されなかった。

5

この結果をまとめると、潰瘍性大腸炎患者35人中24人は間接蛍光抗体法でANCA陽性であり、ウェスタンブロッティングでは35人中11人にANCAと結合する抗原が存在することが確認された(この11人はすべて間接蛍光抗体法でANCA陽性であった)。また35人中の難治性潰瘍性大腸炎患者は7人存在し、この7人中6人にANC Aと結合する抗原がウェスタンブロッティングで検出され、6人中5人に28kDaのバンドが認められた。なお対照としたクローン病患者血清では陽性バンドは認められなかった(図1参照)。

10

この時点で、これらの実験結果は、好中球28kDa抗原に対する抗体の出現が潰瘍性大腸炎の重症度(難治度)を予見させるマーカーになりうることを示唆し、その抗原の単離解析と、単離抗原を用いた簡便な抗体の検出系の開発の重要性を示すものである。

15

#### (実施例4) HL-60細胞に28kDaおよび29kDa抗原が存在することの確認

20

前骨髓性白血病由来の好中球系の細胞であるHL-60細胞株を、5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養し、実施例3に記載の方法で、好中球ライセートを作製した。このライセートを用いて、実施例3と同様にウェスタンブロッティングを行った。好中球ライセートを用いたポジティブコントロールとともに、結果を図2に示す。これより潰瘍性大腸炎患者から得られた抗体画分と結合する28kDa抗原が存在することが確認された。また、この28kDaのバンドは常に太いバンドとして検出され、28kDa抗原に近接して29kDaの抗原の存在が示唆された。

25

#### (実施例5) HL-60細胞からの28kDaおよび29kDa抗原の精製

26

実施例4で抗原の存在が確認されたHL-60細胞株を5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養した。75cm<sup>2</sup>のフラスコあたり $1 \times 10^5$ 個の細胞が $2 \times 10^6$ 個の細胞となつたところで、細胞の総数が $2 \times 10^8$ 個となるように遠心分離して細胞を回収した。6M塩酸グアニジン10mlを加えて溶解し、超音波処理(島津社製USP600)を1

分間行った。この操作で、細胞は完全に溶解した。この溶液と同量の蒸留水を加えて2倍に希釀した後、80,000×g、30分遠心分離して上清を回収した、この上清を分子量3,000以下を除去する膜YM3(アミコン社製)を装着したアミコン限外濾過器(アミコン社製)に移し、PBSを加えながら濾過を行い、続いて濃縮することにより最終的に4mlのPBS溶液とした。このPBS溶液を80,000×g、30分遠心分離して沈澱を除去し、上清を回収した。回収した上清を抗原含有サンプルとし、このサンプルからHPLCを用いて28kDaおよび29kDa画分を分画した。YMC-パックプロテインRPカラム(ワイエムシー社製)を用い、アセトニトリル濃度16%から48%の濃度勾配により蛋白質を溶出した。結果を図3に示す。図3のNo. 9のピークを5  
回収し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥したサンプルをPBSに再溶解し、再びYMC-10  
パックプロテインRPカラムを用いて、アセトニトリル濃度24%から36%の濃度勾配により蛋白質を溶出した。HPLCシステムは島津社製LC-7Aシステムを用いて行15  
った。結果を図4に示す。No. 5およびNo. 6のピークを回収し遠心濃縮乾燥を行った。遠心濃縮乾燥されたサンプルをSDS-PAGEで泳動し、ウェスタンプロットティ  
ングによりPVDF膜(アマシャム社製)に転写し、ポンソウSを用いて染色後、28kD  
aおよび29kDaのバンドを切り抜き、回収した。精製抗原のウェスタンプロットティ  
ングの結果を図5に示す。精製した抗原のSDS-PAGEでは、2種の蛋白質は分離し  
識別可能となった。両蛋白質とも患者血清に反応したことから、細胞ライセート  
からのSDS-PAGEでは、分子量が近接しているため分離できること、あるいは、  
20  
好中球の29kDa抗原含有量が少ないため、検出できないことが考えられる。

#### (実施例6) 部分アミノ酸配列の決定およびホモロジー解析

実施例5で回収された28kDaおよび29kDaのバンドを含む膜を乾燥後、アミノ酸配列の決定に用いた。アミノ酸配列の決定は、島津社製の全自動蛋白質一次構造分析装置PPSQ-10システムを用いて行った。その結果、28kDaのバンドはN-末端25  
の32個の部分アミノ酸配列が決定された。配列は以下の通りであった。

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp (配列番号 1 2)

同様にして、29kDaのバンドのアミノ酸配列を解析したところ、N末端より32個のアミノ酸配列が決定された。配列は以下の通りであった。

5 Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp (配列番号 1 3)

#### (実施例 7) 部分アミノ酸配列のホモロジー解析

実施例 6 で得られたアミノ酸配列についてホモロジー解析を行った。Altschul, S. F. らのBLASTプログラム (J. Mol. Biol. 205, 403-410, 1982) を用いて、既知データベースPIRに含まれる全てのアミノ酸配列に対するホモロジーサーチを行った結果、29kDaの抗原はノンヒストン核蛋白質HMG-1 (Reeck, G. R. Nucleic Acids Res. 17, 1197-1214, 1989) と32アミノ酸中31個が一致した。また、28kDaの抗原はHMG-2 (Majumdar, A. ら Nucleic Acids Res. 19, 6643, 1991) と32アミノ酸中31個が一致した。両抗原とも22番目のシステインが同定できなかった。システインはチオール基を修飾しないと検出できないことから、逆に22番目はシステインと考えられ、SDS-PAGEによる分子量をも考慮に入れて28kDaおよび29kDa抗原は、それぞれHMG-2、およびHMG-1 と同定された。

#### 20 (実施例 8) HMG抗原による患者抗体の吸収試験

実施例 5 で精製したHMG-1およびHMG-2抗原と好中球ライセートを実施例 3 と同様にしてSDS-PAGEを行い、続いてイモビロン膜に転写した。一次抗体として、HMG抗原陽性の潰瘍性大腸炎患者より精製したIgG (0.024mg/ml) とウシHMG-1/2混合物 (0.5mg/ml) を1:2で混合し4℃一晩反応させた抗体溶液を用いた。実施例 3 と同様に洗浄後2次抗体を反応させ、ECLで検出した。その結果、ウシHMG混合溶液で吸収した抗体では、28kDaおよび29kDaのバンドと好中球の28kDaバンドは消失

した(図6)。このことからも29kDaおよび28kDaの抗原はそれぞれHMG-1およびHMG-2と考えられる。

(実施例9) ヒト胸腺組織からのHMG-1およびHMG-2画分の調製

5 HMG-1およびHMG-2はヒトやブタ、ウシの胸腺組織から、前記の文献の方法に従って簡便に調製し得る。子供胸腺組織(13g)を細切片にし、30mlの0.075M NaCl/0.025M EDTA(pH7.5)に懸濁させポリトロンホモゲナイザー(Polytron社製)で氷水中2分間細胞を破壊した(speed 10)。4℃、2,000×g、30分間の遠心分離によりクロマチンを含む沈殿を回収した。この操作をさらに4回繰り返し(但しホモゲナイズの時間は1分)、沈殿を30mlの0.35M NaCl(pH7)に懸濁させ、ホモゲナイザー処理(speed 5、1分)によりクロマチンに結合したHMGを遊離させた。この操作をさらに2回繰り返し90mlの溶液とした。4℃、2,000×g、30分間の遠心分離により不溶物を除去し、得られた上清を2%トリクロロ酢酸溶液とし4℃で1時間放置後HMG-1およびHMG-2以外の不溶性蛋白質を沈殿させた。上清を遠心(4℃、2000×g、30分間)により回収し、2-メルカプトエタノールを終濃度0.01Mになるように加えた。30%アンモニアを1.5ml加え直ちにアセトン300mlを加え攪拌し、4℃で一夜放置した。沈殿してきたHMG-1およびHMG-2を遠心分離により回収し、90%アセトンで洗浄後乾燥させた。この画分を6M塩酸グアニジンに溶解し、透析によるPBSへの置換と濃縮を行いHMG-1およびHMG-2画分とした。このHMG-1およびHMG-2画分はウェスタンプロッティングにより潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した(図7)。また、市販のウシのHMG-1およびHMG-2(和光純薬社製)も、潰瘍性大腸炎患者の抗体と反応した(図7)。従って、HMG-1およびHMG-2は、潰瘍性大腸炎患者の抗原であると考えられる。

25 (実施例10) ブタ胸腺由来HMG-1およびHMG-2の精製

ブタ胸腺由来HMG-1およびHMG-2をM. YoshidaおよびK. Shimura (J. Biochem.

Tokyo, 95, 117-124, 1980)、およびY. Adachiら(J. Chromatogr, 530, 39-46, 1992)の方法に従って精製した。精製法を簡単に述べる。実施例9と同様にして得られたクロマチン画分を0.35M NaCl(pH7)/1mM PMSFに懸濁し、Potter-Elvehjem PTFEホモゲナイザーでホモゲナイズし、5,000×g、20分間遠心分離、上清を回収した。この操作を2回繰り返して、得られた上清を混合した。この画分を2%トリクロロ酢酸溶液とし、遠心分離して沈殿を除去後、上清をさらに10%トリクロロ酢酸溶液とし、析出してきたHMG-1およびHMG-2を含む沈殿を遠心分離して回収した。沈殿を3mlの10mM Tris-HCl(pH7.8)に溶解し、あらかじめ同じ緩衝液で洗浄および平衡化したMono Qカラム(5×50mm、ファルマシア社製)にかけ、分離を行った(ファルマシア社製FPLCシステムを用いた)。溶出は、NaClの0から1Mへの直線濃度勾配により行った。図8に溶出のパターンを示した。この分画法によりほぼ95%以上の純度でHMG-1およびHMG-2が得られた。

ここで得られたHMGは、ウェスタンプロッティングにより患者抗体と反応することが確かめられ、さらにHMG-1画分にはHMG-2、そしてHMG-2画分にはHMG-1が混入していないことが確かめられた(図7)。

#### (実施例11) ウェスタンプロッティングによる、UC患者血清中の抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の検出

ウシHMG-1およびHMG-2混合物(和光純薬社より販売)を抗原としてウェスタンプロッティングを行った。ウシHMG-1(0.5μg)およびHMG-2(0.5μg)混合物をサンプルバッファー(実施例3)に溶解し、常法に従って熱処理後SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE終了後、PVDF膜に転写し、UC患者血清、HRP標識抗ヒトIgG抗体の順で反応させ、ECLにより検出を行った。結果を図9に示した。これらの結果より、UC患者血清中には抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体が存在することが示された。

25

#### (実施例12) ウェスタンプロッティングによる、難治性潰瘍性大腸炎患者血

### 清中の抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体の検出

ブタHMG-1 およびブタHMG-2 混合物を抗原としてウェスタンプロッティングを行った。ブタのHMG-1 (0.5 μg) およびブタのHMG-2 (0.5 μg) 混合物をサンプルバッファー(実施例3)に溶解し、常法に従って熱処理後SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE終了後、PVDF膜に転写し、28kDa陽性の5人の難治性潰瘍性大腸炎患者血清、HRP標識抗ヒトIgG抗体の順で反応させ、ECLにより検出を行った。その結果、5人の難治性潰瘍性大腸炎患者の内4人が陽性であり、1人が28kDa陽性であるが抗原はHMG-1 およびHMG-2ではなかった(図10)。これらの結果より、難治性潰瘍性大腸炎患者血清中には抗HMG-1 抗体および/又は抗HMG-2 抗体が存在することが示された。

### (実施例13) ELISA法による抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体の測定

96ウェルのELISA用プレート(Nunc社製)の各ウェルに5 μg/mlのウシHMG-1 およびHMG-2を50 μlずつ添加し、4℃で24-36時間静置した。過剰の抗原を除去後、5% BSA 200 μlを加え30分以上静置しブロッキングを行った。5% BSAで40倍あるいは80倍希釈した患者血清を50 μl加え2時間室温で静置した。0.05% Tween /0.02% azide/PBS(洗浄液)で5回洗浄後、1000倍希釈のアルカリリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgG(F(ab')2)(フナコシより販売)を100 μl加え、室温で2時間反応させた。洗浄液で5回洗浄後、0.1%のp-nitrophenyl phosphate, disodium(pNPP)(Sigma社製)溶液(10%ジエタノールアミン溶液)を100 μl加え、室温で20-25分反応させ、405nmの吸光度を測定した。

図11に陽性コントロールの検量線を示した。この検量線から、ウシHMG-1 およびHMG-2を用いたELISA法により抗HMG-1 抗体および/又は抗HMG-2 抗体が測定できることがわかった。さらに潰瘍性大腸炎患者68人の血清を測定した結果、20人(29.4%)が陽性であり、健常人7.1%(4/20人)に比べ有意に高い陽性率を示した。尚、健常人コントロールのmean+3SD以上を陽性とした。また、潰瘍性大腸炎患

者の内、難治性患者では7人中5人が陽性(71.4%)と高い陽性率を示した。

(実施例14) ELISA法による抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定

ブタHMG-1、ブタHMG-2、ヒトHMG-1およびヒトHMG-2混合物を抗原に用いてELISAを行った。96ウェルのマキシソーププレート(Nunc社製)の各ウェルに6.25  $\mu$ g/mlから段階希釈したブタHMG-1あるいはブタHMG-2を50  $\mu$ l、またヒトの場合6.25  $\mu$ g/mlから段階希釈したHMG-1およびHMG-2(等量混合物)を50  $\mu$ l添加し、4℃で24-36時間静置した。過剰の抗原を除去後、5%BSA200  $\mu$ lを加え30分以上静置しブロッキングを行った。抗HMG-1抗体および/又は抗HMG-2抗体陽性難治性潰瘍性大腸炎患者血清を標準血清として、これを5%BSAで40倍希釈したものを50  $\mu$ l加え2時間室温で静置した。0.05%Tween/0.02%azide/PBS(洗浄液)で5回洗浄後、1000倍希釈のアルカリリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>(Immunotech S.A.社製)を100  $\mu$ l加え、室温で2時間反応させた。洗浄液で5回洗浄後、0.1%パラニトロフェニルリン酸(Sigma社製)溶液(10%ジエタノールアミン溶液)を100  $\mu$ l加え、室温で20-25分反応させ、405nmの吸光度を測定した。図12に陽性コントロールの検量線を示した。3種のELISAとも用量依存的な直線が得られ、この検量線から、ブタHMG-1(図12-1)、HMG-2(図12-2)あるいはヒトHMG-1およびヒトHMG-2混合物(図12-3)を用いたELISA法により抗HMG-1抗体および/または抗HMG-2抗体が測定できることがわかった。また、測定には吸光度がほぼ1.0になる5  $\mu$ g/mlの濃度のものを用いればよいことが、この検量線から示唆された。

(実施例15) AIHにおける抗HMG-1抗体及び抗HMG-2抗体の測定

このELISA系を用いてAIH患者、B型肝炎患者、C型肝炎患者の抗体を測定した。一方、コントロールとして健常人33人の血清を用いた。抗原としてブタのHMG-1およびHMG-2をそれぞれ、5  $\mu$ g/mlの濃度で用いた。また血清として、標準血清を40倍希釈したものを測定に供した。標準血清の吸光度から抗原を加えないブランク

のウェルの吸光度を引いた値を100%とし、同様にプランク値を引いた被検血清の吸光度値からその割合を算出し被検血清の値とした。血清の40倍希釈で値が高すぎた場合には80倍以上の希釈で測定を行い値を算出した。結果は健常人のmean +2 s. d. を超える値を陽性とした。

5 抗HMG抗体陽性率と抗核抗体陽性率を比較するため、間接蛍光抗体法による抗核抗体を同一検体につき測定した。測定はMBL社製フルオロHEPANAテストを用い、AIHでは80倍希釈以上を、B型肝炎およびC型肝炎は20倍希釈以上を陽性とした。

10 表4に抗原別及び疾患別の陽性率を示した。AIHで86%と高陽性、C型肝炎で2%と比較的高陽性を示した。一方、B型肝炎は12%で健常人と有意差はなかった。このことより、肝炎においてはB型肝炎は除外診断が可能なこと、抗HMG-1/2抗体陽性ではAIHである可能性が高いことが明らかになった。

また、抗核抗体との比較では、AIHとC型肝炎において抗HMG1/2抗体陽性率が抗核抗体陽性率より高かった。このことよりAIHとC型肝炎では抗核抗体より感度良く疾患を診断できることが明らかとなった。

15

表4

疾患名	n	陽性数 (%)		
		HMG-1	HMG-2	HMG-1+HMG-2
自己免疫性肝炎	29	23 (79)	24 (83)	25 (86)
C型肝炎	26	2 (8)	2 (8)	3 (12)
B型肝炎	30	8 (27)	7 (23)	8 (27)
健常人	31	0 (0)	0 (0)	0 (0)

#### (実施例16) 各疾患における抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定

このELISA系を用いて自己免疫疾患および炎症性疾患患者の抗体を測定した。

25 用いた疾患は以下の通りである。慢性関節リウマチ50人、全身性エリテマトーデス47人、シェーグレン症候群12人、ベーチェット病32人、多発性筋炎/皮膚筋炎1

5人、強皮症20人、原発性胆汁性肝硬変41人、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発性動脈炎19人、潰瘍性大腸炎62人、およびクローン病15人である。一方、コントロールとして健常人33人の血清を用いた。抗原としてブタのHMG-1およびHMG-2をそれぞれ、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いた。また血清として、標準血清を40倍希釈したものを測定に供した。各プレートには被検血清用とは別に、実施例12と同様の検量線用の抗原を置き、標準血清(40倍希釈)を用いて、被検血清と同時に、実施例12に従って測定を行った。各プレートから図11の様な直線性の検量線が得られた場合のみ、同プレート中の検体の測定値を有効とした。標準血清の吸光度から抗原を加えないブランクのウェルの吸光度を引いた値を100%とし、同様にブランク値を引いた被検血清の吸光度値からその割合を算出し被検血清の値とした。血清の40倍希釈で値が高すぎた場合には80倍以上の希釈で測定を行い値を算出した。結果は健常人のmean $\pm$ 2 s. d.を超える値を陽性とした。

抗HMG抗体陽性率と抗核抗体陽性率とを比較するため、間接蛍光抗体法による抗核抗体を同一検体につき測定した。測定はMBL社製フルオロHEPANAテストを用いて行い、40倍希釈以上を陽性とした。

表5に抗原別および疾患別の陽性率、図13にHMG-1を抗原に用いた疾患別の散布図、図14にHMG-2を抗原に用いた疾患別の散布図を示した。

表 5

疾 患 名	HMG-1			HMG-2			HMG-1 + HMG-2*			陽性率(%)
	n	陽性数	陽性率(%)	n	陽性数	陽性率(%)	n	陽性数	陽性率(%)	
慢性関節リウマチ (RA)	50	31	62.0	17	34.0	34	66.0	29	58.0	
全身性エリテマトーデス (SLE)	47	29	61.7	15	31.9	31	66.0	39	83.0	
シェーグレン症候群 (SjS)	12	9	75.0	1	8.3	n.c.#	75.0	9	58.3	
多発性筋炎／皮膚筋炎 (PM/DM)	15	3	20.0	2	13.3	n.c.	20.0	10	15.6	
強皮症 (PSS)	20	11	55.0	2	10.0	n.c.	55.0	19	85.0	
ベーチェット病 (Bechet)	32	10	31.3	6	18.8	12	37.5	9	53.3	
原発性胆汁性肝硬変 (PBC)	41	28	68.3	24	47.8	32	78.0	11	26.8	
顕微鏡的多発性動脈炎 / 多発性動脈炎 (MPN/PN)	19	8	42.1	3	15.0	n.c.	42.1	3	15.8	
潰瘍性大腸炎 (UC)	62	24	38.7	21	33.9	25	40.3	12	19.4	
クローン病 (CD)	15	6	40.0	4	26.7	7	46.7	1	6.7	
健常人 (Normal)	33	1	3.0	1	3.0	2	6.1	1	3.0	

\*: HMG-1陽性数にHMG-2のみ陽性数を加えた値

# : 変化なし

原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、およびベーチェット病では、抗HMG-1抗体陽性率と抗HMG-2抗体陽性率がほぼ同等の値を示した。しかし、他の7疾患では、抗HMG-1抗体陽性率の方が高く(表5)、HMG-1の方が抗原性が強いことがわかった。特にシェーグレン症候群ではHMG-1が66.7%に対してHMG-2が16.7%と、圧倒的にHMG-1有意であり、このことはシェーグレン症候群の絞り込みに利用できる可能性を示すものである。HMG-1では、多発性筋炎/皮膚筋炎を除く9疾患はいずれも健常人と比較すると統計的に有意な差を示した。一方、HMG-2では、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、ベーチェット病、原発性胆汁性肝硬変および潰瘍性大腸炎が健常人と比較すると統計的に有意な差を示した。抗HMG-2抗体陽性患者は殆どが抗HMG-1抗体陽性であったが、抗HMG-2抗体陽性で抗HMG-1抗体陰性の患者も少数であるが存在していた。従って、より感度の高い診断を行うためには、両抗体を測定する方がよいと考えられる。

抗HMG-1抗体と抗HMG-2抗体陽性を加えた結果では、原発性胆汁性肝硬変、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、および全身性エリテマトーデスで非常に高い陽性率を示した。原発性胆汁性肝硬変では、抗ミトコンドリア抗体と同等かそれ以上の陽性率と考えられ、残りの3疾患ではこのように高い陽性率を示す抗原は今まで発見されていない。また、強皮症、潰瘍性大腸炎、クローン病、顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎、ベーチェット病でも陽性率は高く、前3疾患についてはこのような高い陽性率を示す抗原はHMG抗原が初めてである。顕微鏡的多発血管炎/結節性多発動脈炎については、ミエロバーオキシダーゼが高い陽性率を示す抗原であるが、HMGはこれに次ぐ抗原である。本願発明において抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体が、多発性筋炎/皮膚筋炎を除く9疾患で同時に検出できる抗体であることが明らかになった。

そこで、今回、各疾患について間接蛍光抗体法で抗核抗体を同時に測定し、HMG抗原陽性率と比較した(表5)。10疾患の内7疾患が抗核抗体陽性率と同等かそれ以上の値を示した。これより、HMG-1およびHMG-2の測定は、間接蛍光抗体法に

による抗核抗体の検出に代わり得る自己免疫疾患診断法となる可能性が示された。また、抗核抗体検査との併用により、より広く確実に自己免疫疾患を診断できると考えられる。

## 5 産業上の利用可能性

慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ペーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、および自己免疫性肝炎の共通の対応抗原HMG-1 およびHMG-2 を特定できたことにより、当該抗原を用いた簡便な抗体の検出が可能となつた。さらに、HMG-1 およびHMG-2 を用いた両抗原に対する抗体を測定する方法および測定キットはこれら疾患の診断薬が提供される。

## 配列表

配列番号 1

配列の長さ : 214

配列の型 : アミノ酸

5 配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

起源 : ヒト

配列

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe
10				5			10				15						
Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Ser	Val	Asn
20				25				30			35						
Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg	Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys
				40			45			50							
15	Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala	Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu
	55			60				65			70						
Glu	Met	Lys	Thr	Tyr	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp	
	75			80			85			90							
Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	Tyr
20			95			100			105								
Arg	Pro	Lys	Ile	Lys	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Lys
	110			115			120			125							
Lys	Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr	Glu
	130			135			140										
25	Lys	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Tyr
	145			150			155			160							

Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser  
 165 170 175 180  
 Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
 185 190 195  
 5 Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 200 205 210

配列番号：2

配列の長さ：208

10 配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2

起源：ヒト

配列

15 Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15  
 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn  
 20 25 30 35  
 Phe Ala Glu Phe Ser Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
 20 40 45 50  
 Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg  
 55 60 65 70  
 Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Asp  
 75 80 85 90  
 25 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His  
 95 100 105

	Arg Pro Lys Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys			
110		115	120	125
	Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu			
130		135	140	
5	Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg			
145		150	155	160
	Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser			
165		170	175	180
	Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu			
10		185	190	195
	Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu			
	200	205		

---

## 配列番号 3

15 配列の長さ : 214

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

起源 : ウシ

20 配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5 10 15

Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

20 25 30 35

25 Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys

40 45 50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg  
 55 60 65 70

Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Phe Lys Asp  
 75 80 85 90

5 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr  
 95 100 105

Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys  
 110 115 120 125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu  
 10 130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160

Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser  
 165 170 175 180

15 Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu  
 185 190 195

Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 200 205 210

20 配列番号：4

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-1

25 起源：ブタ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15

Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn  
 20 25 30 35

5 Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
 40 45 50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg  
 55 60 65 70

Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Phe Lys Asp  
 10 75 80 85 90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr  
 95 100 105

Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys  
 110 115 120 125

15 Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys His Pro Tyr Glu  
 130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160

Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser  
 20 165 170 175 180

Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
 185 190 195

Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 200 205 210

25

配列番号：5

配列の長さ : 214

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

5 起源 : ラット

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5 10 15

Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

10 20 25 30 35

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys

40 45 50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg

55 60 65 70

15 Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Phe Lys Asp

75 80 85 90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr

95 100 105

Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys

20 110 115 120 125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys His Pro Tyr Glu

130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg

145 150 155 160

25 Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser

165 170 175 180

Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
 185 190 195  
 Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu  
 200 205 210

5

配列番号 6

配列の長さ : 209

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

10 配列の特徴 : HMG-2

起源 : ブタ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15

15 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn  
 20 25 30 35

Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
 40 45 50

Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg  
 20 55 60 65 70

Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Asp  
 75 80 85 90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His  
 95 100 105

25 Arg Pro Lys Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys  
 110 115 120 125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu  
 130 135 140  
 Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 5 Ala Lys Gly Lys Gly Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser  
 165 170 175 180  
 Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp  
 185 190 195  
 Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu  
 10 200 205

配列番号：7

配列の長さ：186

配列の型：アミノ酸

15 配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2の部分配列

起源：ウシ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 20 5 10 15  
 Val Gln Thr Ser Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn  
 25 20 25 30 35  
 Phe Ser Glu/Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp  
 40 45 50  
 25 Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro  
 55 60 65 70

Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro  
 75 80 85 90  
 Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Ser Ala Glu His Arg Pro Lys Ile Lys Ala Glu  
 95 100 105  
 5 His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser  
 110 115 120 125  
 Gln Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Gln Lys Ala Ser Lys Leu Lys  
 130 135 140  
 Glu Lys Tyr Glu Lys Xaa Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly  
 10 145 150 155 160  
 Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp  
 165 170 175 180  
 Glu Glu Glu Glu Glu  
 185  
 15

配列番号 : 8

配列の長さ : 209

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

20 配列の特徴 : HMG-2

起源 : ラット

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
 5 10 15  
 25 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn  
 20 25 30 35

Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
 40 45 50

Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg  
 55 60 65 70

5 Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Asp  
 75 80 85 90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His  
 95 100 105

Arg Pro Lys Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys  
 10 110 115 120 125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu  
 130 135 140

Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160

15 Ala Lys Gly Lys Ser Glu Val Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser  
 165 170 175 180

Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp  
 185 190 195

Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu

20 200 205

配列番号：9

配列の長さ：206

配列の型：アミノ酸

25 配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2

起源：チキン

## 配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Tyr Phe  
5 10 15

5 Val Gln Thr Cys Pro Arg Glu His Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn  
20 25 30 35

Phe Ala Glu Phe Ser Arg Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys  
40 45 50

10	55	60	65	70													
Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Glu	Glu	Met	Ala	Lys	Gly	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Asp	Arg

Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp  
75 80 85 90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His  
95 100 105

15 Arg Pro Lys Ile Lys Asn Asp His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys  
110 115 120 125

20	145	150	155	160
----	-----	-----	-----	-----

Ala Lys Ser Lys Ser Asp Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Ala Gly Ser  
165 170 175 180

Lys Lys Lys Ala Glu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu  
185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199

25 Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
200 205

配列番号 10

配列の長さ : 201

配列の型 : アミノ酸

5 配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-2a

起源 : チキン

	Ala Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Lys Gly Lys Met Ser Ala Tyr Ala Phe Phe			
	5	10	15	
10	Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro Glu Val Pro Val Asn			
	20	25	30	35
	Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys			
	40	45	50	
	Glu Lys Ala Lys Phe Asp Glu Met Ala Lys Ala Asp Lys Val Arg Tyr Asp Arg			
15	55	60	65	70
	Glu Met Lys Asp Tyr Gly Pro Ala Lys Gly Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn			
	75	80	85	90
	Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Gly Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro			
	95	100	105	
20	Lys Ile Lys Ser Thr Asn Pro Gly Ile Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu			
	110	115	120	125
	Gly Glu Met Trp Asn Asn Leu Ser Asp Gly Glu Lys Gln Pro Tyr Asn Asn Lys			
	130	135	140	
	Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Val Ala Asp Tyr Lys Ser Lys			
25	145	150	155	160
	Gly Lys Phe Asp Gly Ala Lys Gly Ala Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Lys Val			

165 170 175 180  
Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Asp  
185 190 195  
Asp Asp Glu  
5 200

配列番号 1 1

配列の長さ : 208

### 配列の型：アミノ酸

## 10 配列の種類：ペプチド

起源：マウス

### 配列の特徴：HMG-2

Gly Lys Gly Asp Pro Ile Lys Pro Leu Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe  
5 10 15

15 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asn Ser Ser Val Asn  
20 25 30 35

Phe Ala Glu Ile Ser Lys Lys Cys Ser Lys Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys  
40 45 50

	Glu	Asn	Ser	Lys	Phe	Glu	Asp	Leu	Ala	Lys	Ser	Asp	Lys	Ala	Cys	Tyr	Tyr	Arg
20	55				60					65					70			

Glu Met Lys Asn Tyr Val Ser Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp  
75 80 85 90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Cys Leu Phe Cys Ser Glu Asn  
95 100 105

25 Arg Pro Lys Ile Lys Ile Glu Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys  
 110 115 120 125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Glu Lys Gln Pro Tyr Glu  
 130 135 140  
 Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Phe Ala Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 5 Val Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Ala Gly Ser  
 165 170 175 180  
 Lys Lys Lys Asn Asp Ser Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 185 190 195  
 Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 10 200 205

配列番号 1 2

配列の長さ : 32

配列の型 : アミノ酸

15 配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 28kDaN末端フラグメント

起源

細胞の種類 : 前骨髓性白血病由来の好中球系細胞

セルライン : 好中球系の細胞株(ATCC CCL-240)

20 配列の特徴

配列を決定した方法 : E

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5 10 15

25 Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp

20 25 30

配列番号 1 3

配列の長さ : 32

配列の型 : アミノ酸

5 配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 29kDaN末端フラグメント

起源

細胞の種類 : 前骨髓性白血病由来の好中球系細胞

セルライン : 好中球系の細胞株(ATCC CCL-240)

10 配列の特徴

配列を決定した方法 : E

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5

10

15

Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp

15

20

25

30

## 請求の範囲

1. HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患の診断薬：

5 ここで、該ポリペプチドが好中球28kDa抗原であるときは該自己免疫疾患は潰瘍性大腸炎ではない。

10 2. 前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病または自己免疫性肝炎である、請求項1に記載の診断薬。

3. 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、またはラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項1に記載の診断薬。

15 4. HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患を診断するためのキット：

ここで、該ポリペプチドが好中球28kDa抗原であるときは該自己免疫疾患は潰瘍性大腸炎ではない。

20 5. 前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病または自己免疫性肝炎である、請求項4に記載のキット。

6. 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウスまたはラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項4に記載のキット。

25 7. 自己免疫疾患患者の抗体を検出する方法であって、該方法はHMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、

あるいはそれらの断片であって当該患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する試薬と、自己免疫疾患患者の体液成分とを反応させる工程を含む方法：

ここで、該ポリペプチドが好中球28kDa抗原であるときは該自己免疫疾患は潰瘍性大腸炎ではない。

8. 前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、強皮症、原発性胆汁性肝硬変、顕微鏡的多発血管炎／結節性多発動脈炎、潰瘍性大腸炎、クローン病または自己免疫性肝炎である、請求項7に記載の方法。

10 9. 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウスまたはラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項7に記載の方法。

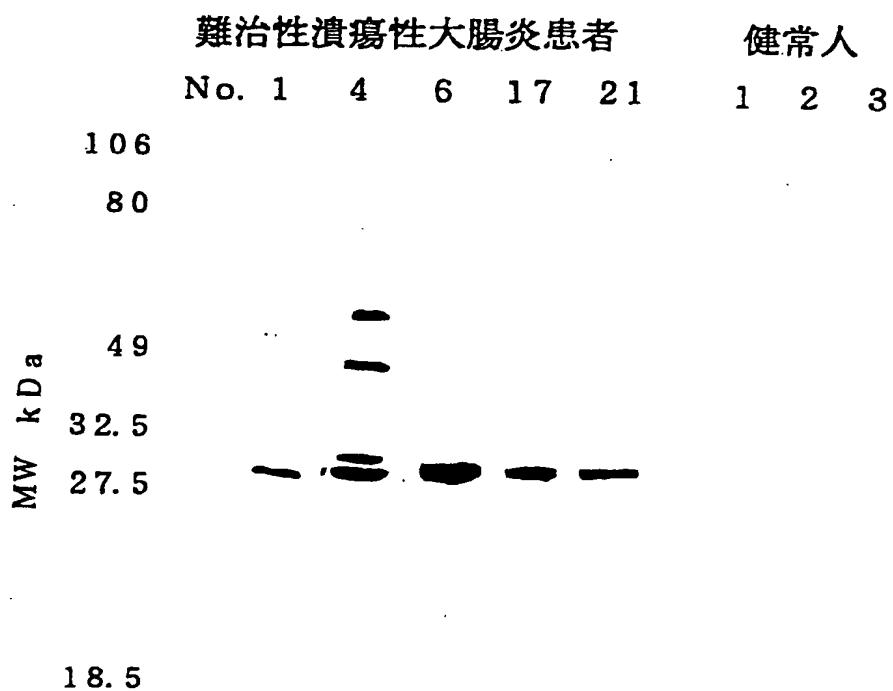


図 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

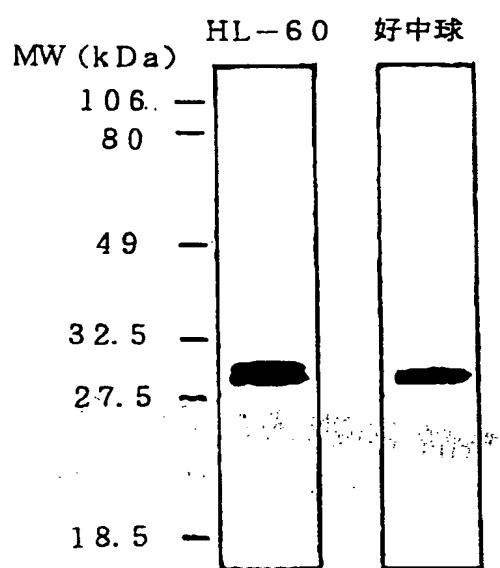


図 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

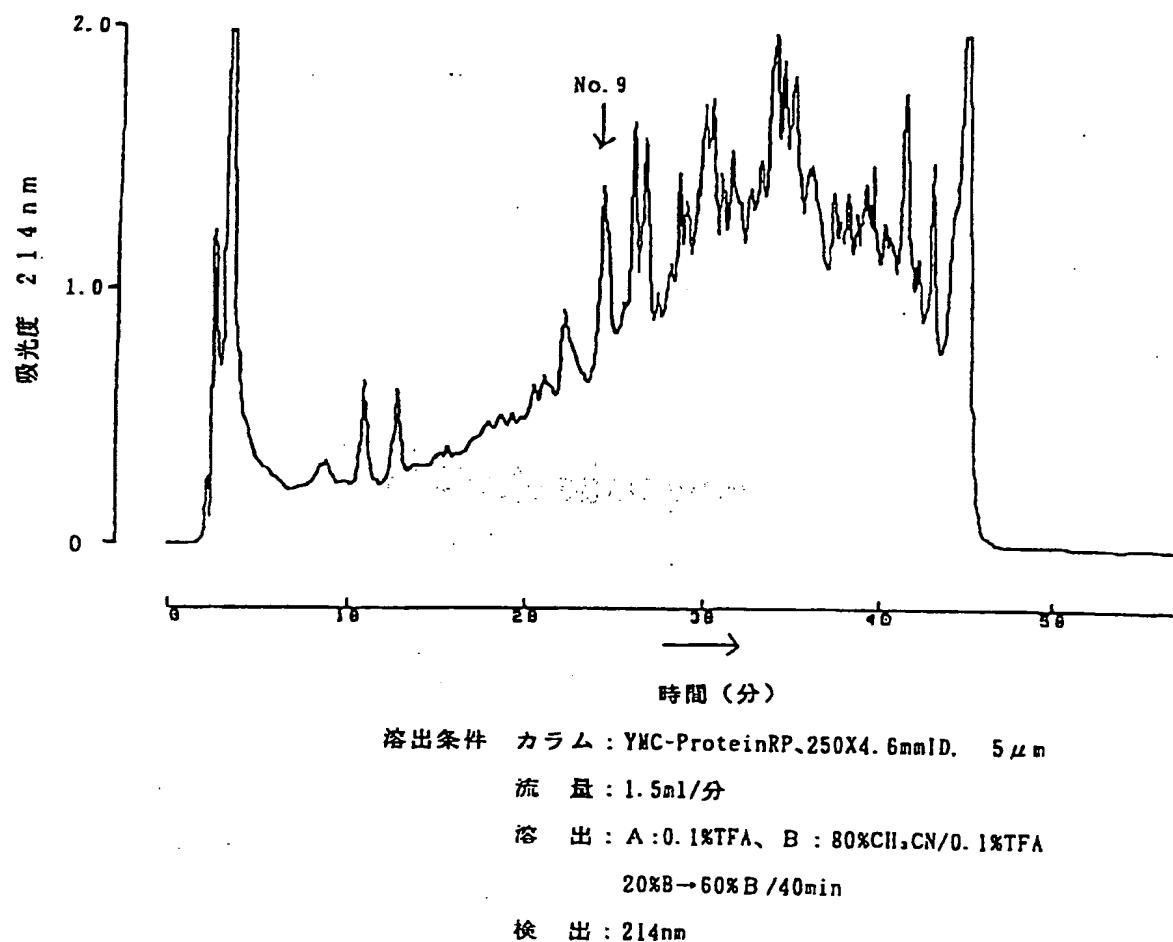
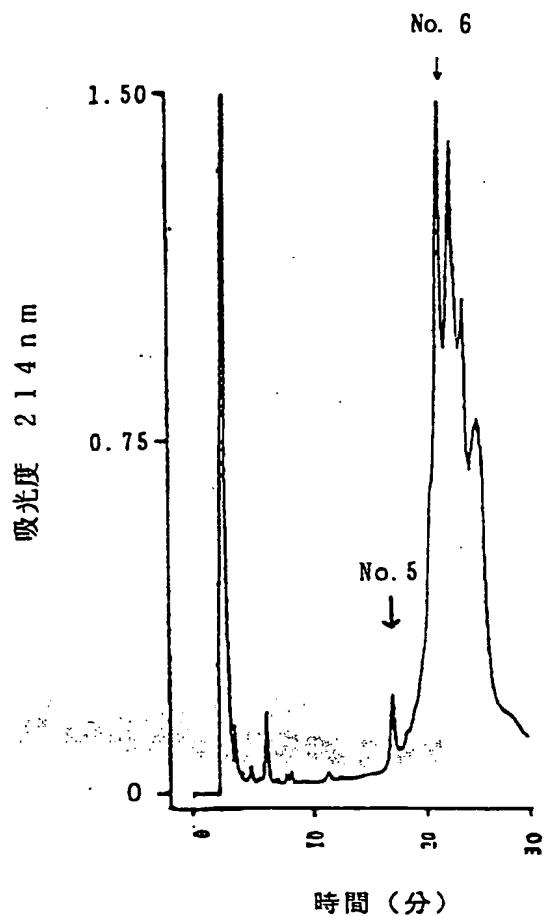


図 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



溶出条件 カラム : YMC-ProteinRP、250×4.6mmID, 5  $\mu$ m

流 量 : 1.5ml/分

溶 出 : A : 0.1%TFA、B : 80%CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA  
30% B → 45% B /30min

検 出 : 214nm

図 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

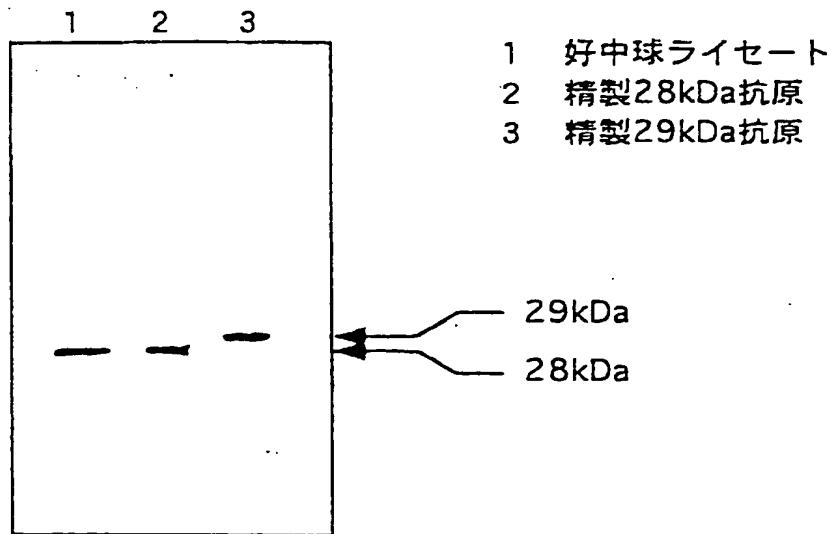


図 5

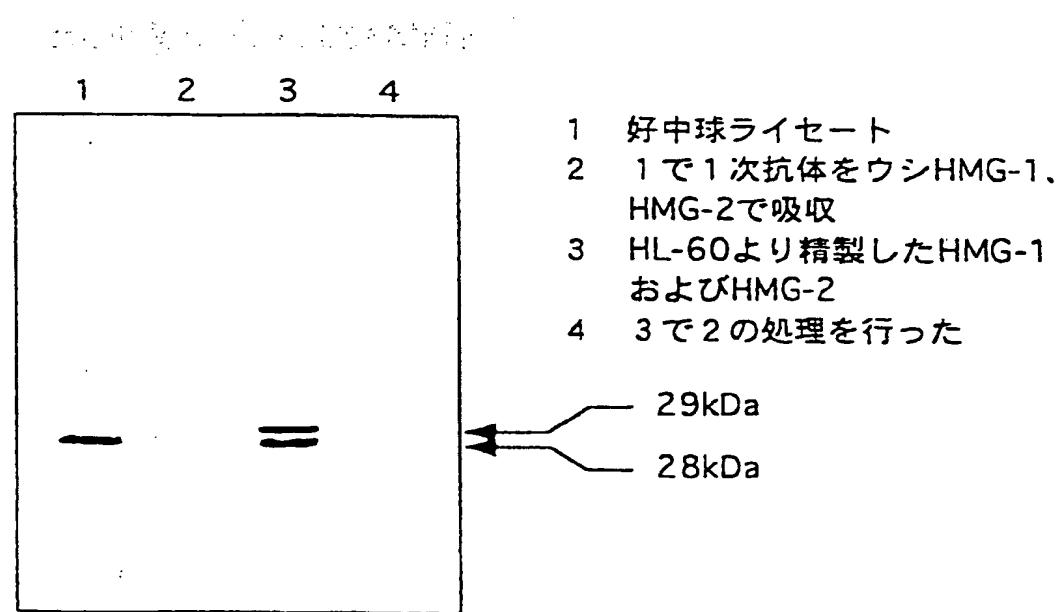


図 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

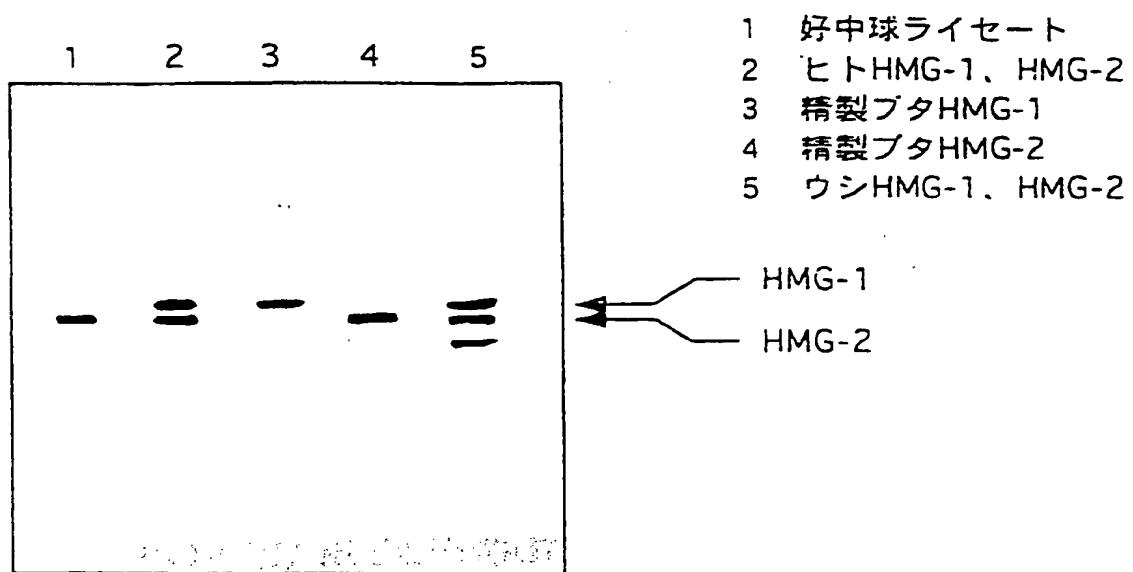


図 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

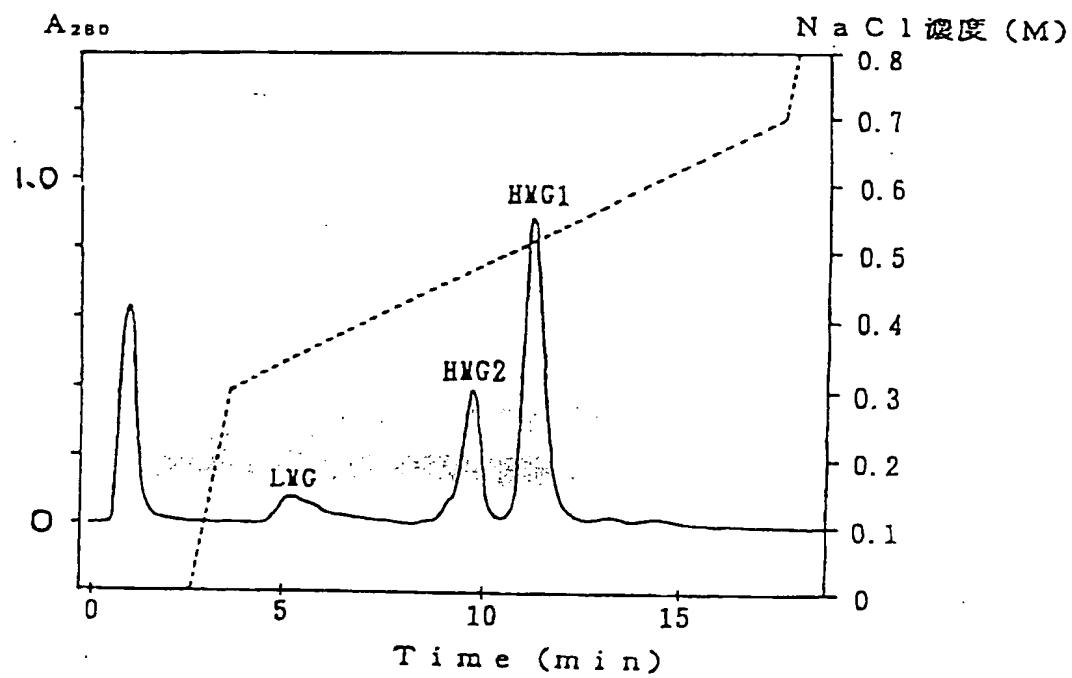


図 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

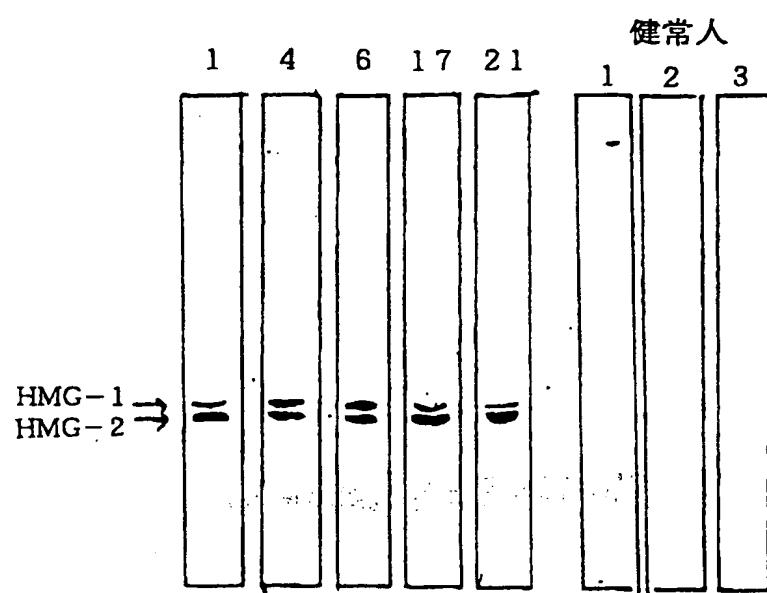


図 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

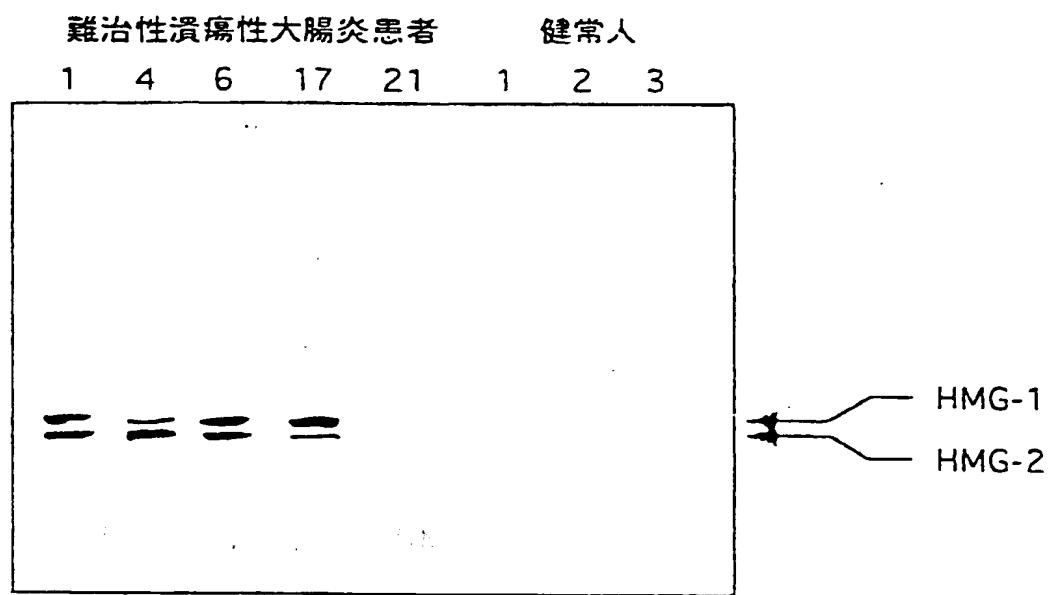


図 10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

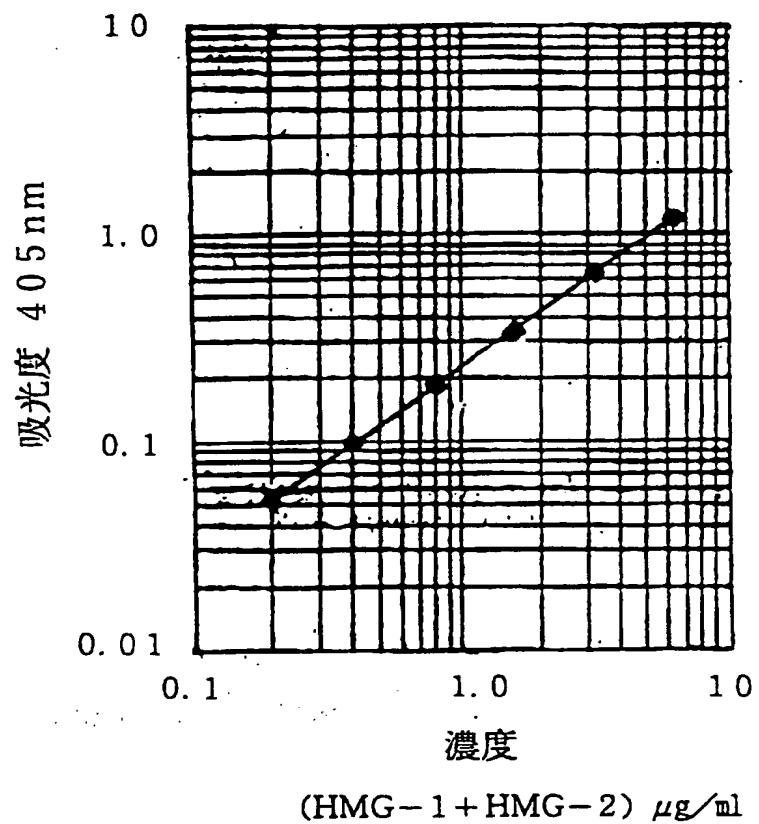


図 1 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図12-1

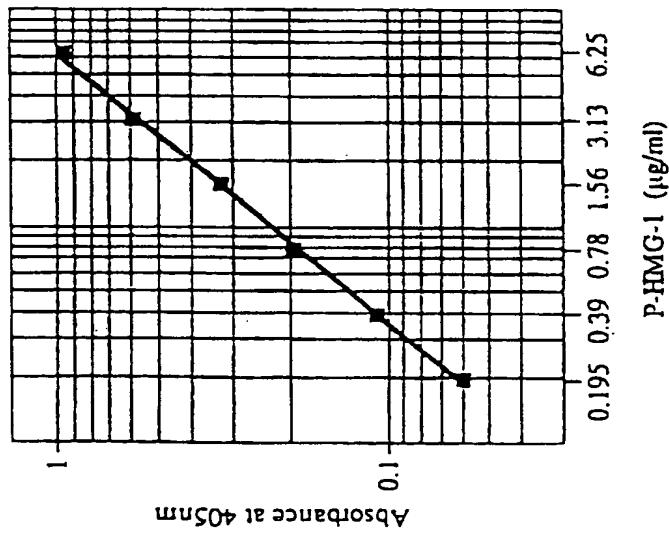


図12-2

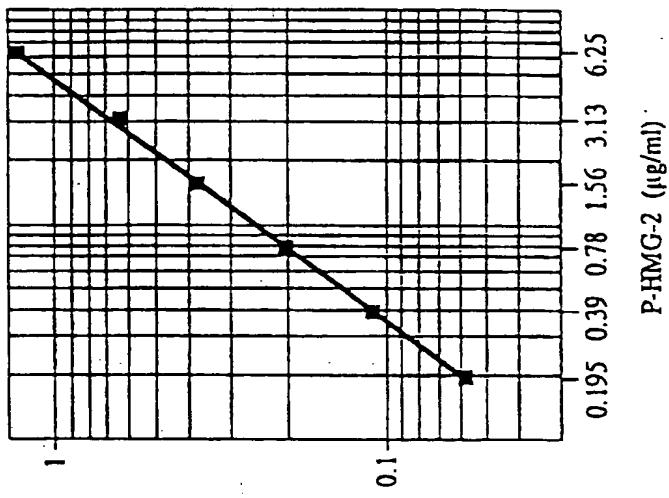


図12-3

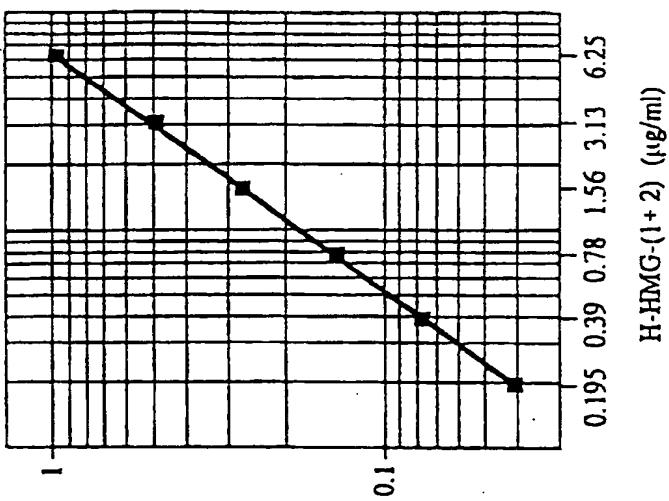


図12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK**

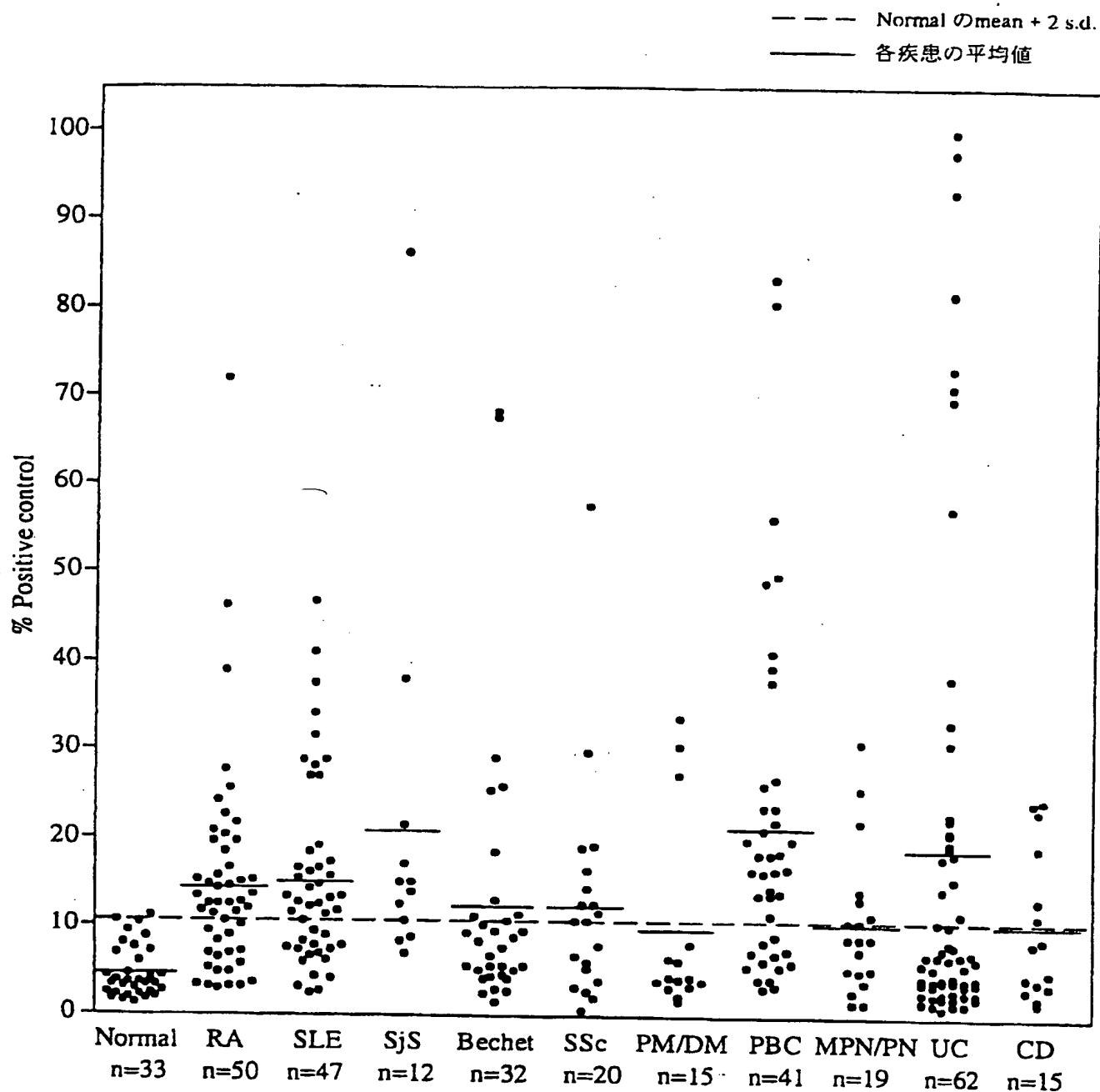


図 1 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

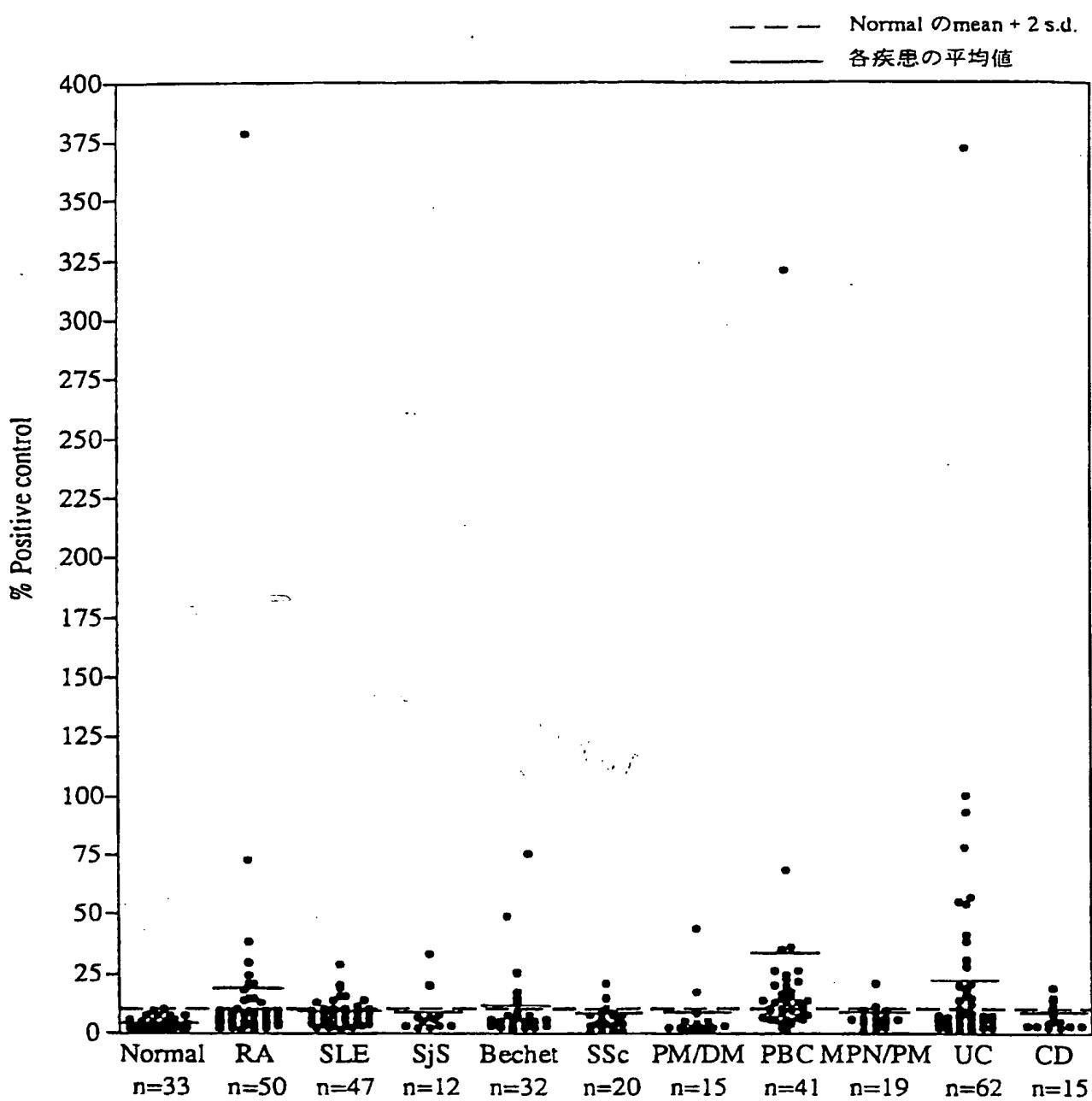


図 1 4

THIS PAGE BLANK (OPTIONAL)

ヒト	1 GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQT CREEHKKHPDASVNFSFSKKCSERWKT	50
ブタ	1 GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQT CREEHKKHPDASVNFSFSKKCSERWKT	50
ウシ	1 GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQT CREEHKKHPDASVNFSFSKKCSERWKT	50
ラット	1 GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQT CREEHKKHPDASVNFSFSKKCSERWKT	50
ヒト	51 MSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTY IPPKGETKKFKDPNAPKRPPSA	100
ブタ	51 MSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTY IPPKGETKKFKDPNAPKRPPSA	100
ウシ	51 MSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTY IPPKGETKKFKDPNAPKRPPSA	100
ラット	51 MSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTY IPPKGETKKFKDPNAPKRPPSA	100
ヒト	101 FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAAL	150
ブタ	101 FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAAL	150
ウシ	101 FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAAL	150
ラット	101 FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAAL	150
ヒト	151 KEKYEKDI AAYRAKGKPDAAKKGVVKAEKSKKKEEEEDEEDEEEEEE	200
ブタ	151 KEKYEKDI AAYRAKGKPDAAKKGVVKAEKSKKKEEEEDEEDEEEEEE	200
ウシ	151 KEKYEKDI AAYRAKGKPDAAKKGVVKAEKSKKKEEEEDEEDEEEEEE	200
ラット	151 KEKYEKDI AAYRAKGKPDAAKKGVVKAEKSKKKEEEEDEEDEEEEEE	200
ヒト	201 DEEDEDEEEEDDDDE	214
ブタ	201 DEEDEEEEDDDDE	214
ウシ	201 DEEDEEEEDDDDE	214
ラット	201 EEEDEDEEEEDDDDE	214

図15 ヒト、ブタ、ウシ及びラットHMG-1のアミノ酸配列の比較。  
ヒトと比較して同一のアミノ酸を縦棒で示してある。

THIS PAGE BLANK (USP10)

ヒト	1	GKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKHPDSSVNFAEFSKKCERWKT	50
ブタ	1	GKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKHPDSSVNFAEFSKKCERWKT	50
ウシ	1	GKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTSREEHKKHPDASVNF---S---ERWKT	50
ラット	1	GKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKHPDSSVNFAEFSKKCERWKT	50
ヒト	51	MSAKEKSKFEDMAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ブタ	51	MSAKEKSKFEDMAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ウシ	51	MSAKEKSKFEDMAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ラット	51	MSAKEKSKFEDLAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKKDPNAPKRPPSA	100
ヒト	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGEMWSEQSAKDKQPYEQKAAKL	150
ブタ	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGEMWSEQSAKDKQPYEQKAAKL	150
ウシ	101	FFLFSAEHRPKIKAEPGLSIGDTAKKLGEMWSQQSAKDKQPYEQKASKL	150
ラット	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGEMWSEQSAKDKQPYEQKAAKL	150
ヒト	151	KEKYEKDIAYRAKGKSEAGKKGPGRPTGSKKNEPEDEEEEEEE-DED	199
ブタ	151	KEKYEKDIAYRAKGKGEAGKKGPGRPTGSKKNEPEDEEEEEEEDED	200
ウシ	151	KEKYEKX-AAYRAKGKSEAGKKGPGRPTGSKKNEPEDEEEEEEE.....	200
ラット	151	KEKYEKDIAYRAKGKSEVGKKGPGRPTGSKKNEPEDEEEEEEEDED	200
ヒト	200	EEEEDEDEE	208
ブタ	201	EEEEDEDEE	209
ウシ	201	.....	
ラット	201	EEEEDEDEE	209

図 1 6 ヒト、ブタ、ウシ及びラットHMG-2のアミノ酸配列の比較。  
ヒトと比較して同一のアミノ酸を縦棒で示してある。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> G 01 N 33/564

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> G 01 N 33/564

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Arthritis & Rheumatism 37 (1). 1994. Ayer L M; Rubin R L; Dixon G H; Fritzler M J [Antibodies to HMG proteins in patients with drug-induced autoimmunity] p. 98-103	1-9
A	Journal of Chromatography 530 . 1990. Yoshifumi Adachi; Shigeki Mizuno; Michiteru Yoshida [Efficient large-scale purification of non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG 2 by using Polybuffer-exchanger PBE94] p. 39-46	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.09.97

国際調査報告の発送日

14.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

2 J 9507

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Biochemistry 95. 1984. Michiteru Yoshida;Kensuke Shimura「Unwinding of DNA by Nonhistone Chromosomal Protein HMG(1+2) from Pig Thymus as Determined with Endonuclease」p. 117-124	1-9

## 特許協力条約

E P

US

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 KA016PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/01647	国際出願日 (日.月.年) 15.05.97	優先日 (日.月.年) 17.07.96
出願人(氏名又は名称) 鐘淵化学工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

- 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
- 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
- この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
  - この国際出願と共に提出されたもの
  - 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
    - しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
    - この国際調査機関が書換えたもの
- 発明の名称は  出願人が提出したものを承認する。
  - 次に示すように国際調査機関が作成した。
- 要約は  出願人が提出したものを承認する。
  - 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
- 要約書とともに公表される図は、  
第    図とする。  出願人が示したとおりである.  なし
  - 出願人は図を示さなかった。
  - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>6</sup> G 01 N 33/564

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> G 01 N 33/564

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Arthritis & Rheumatism 37 (1). 1994. Ayer L M; Rubin R L; Dixon G H; Fritzler M J [Antibodies to HMG proteins in patients with drug-induced autoimmunity] p. 98-103	1-9
A	Journal of Chromatography 530 . 1990. Yoshifumi Adachi; Shigeki Mizuno; Michiteru Yoshida [Efficient large-scale purification of non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG 2 by using Polybuffer-exchanger PBE94] p. 39-46	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 09. 97

国際調査報告の発送日

14.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目 4番 3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子



2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Journal of Biochemistry 95. 1984. Michiteru Yoshida;Kensuke Shimura [Unwinding of DNA by Nonhistone Chromosomal Protein HMG(1+2) from Pig Thymus as Determined with Endonuclease] p. 117-124	1-9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 16 OCT 1998

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 KA016PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/01647	国際出願日 (日.月.年) 15.05.97	優先日 (日.月.年) 17.07.96
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>®</sup> G01N33/564		
出願人（氏名又は名称） 鐘淵化学工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 1 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I  国際予備審査報告の基礎  
II  優先権  
III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV  発明の単一性の欠如  
V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI  ある種の引用文献  
VII  国際出願の不備  
VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.12.97	国際予備審査報告を作成した日 23.09.98
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 黒田浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3252
	2 J 9507

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする）

 出願時の国際出願書類

明細書 第 1~32、34~52 ページ、  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
 明細書 第 33 ページ、  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、

出願時のもの  
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 25.02.98 付の書簡と共に提出されたもの  
 付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 1~9 項、  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、

出願時に提出されたもの  
 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 付の書簡と共に提出されたもの  
 付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 1~15 ページ/図、  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、

出願時に提出されたもの  
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 付の書簡と共に提出されたもの  
 付の書簡と共に提出されたもの

2. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図

3.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c)）

4. 追加の意見（必要ならば）

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-9 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-9 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-9 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

2. 文献及び説明

請求の範囲 1-9

文献1 : Arthritis & Rheumatism 37 (1), 1994, p. 98-103  
には、HMG-1、HMG-2を用いた免疫分析について記載されているが、HMG-1、HMG-2を使った免疫診断薬で、該ポリペプチドが好中球28kDa抗原であるときには該自己免疫疾患が潰瘍性大腸炎でないことを示す記載はない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

のウェルの吸光度を引いた値を100%とし、同様にプランク値を引いた被検血清の吸光度値からその割合を算出し被検血清の値とした。血清の40倍希釈で値が高すぎた場合には80倍以上の希釈で測定を行い値を算出した。結果は健常人のmean  $\pm 2$  s. d. を超える値を陽性とした。

5 抗HMG抗体陽性率と抗核抗体陽性率を比較するため、間接蛍光抗体法による抗核抗体を同一検体につき測定した。測定はMBL社製フルオロHEPANAテストを用い、AIHでは80倍希釈以上を、B型肝炎およびC型肝炎は20倍希釈以上を陽性とした。

10 表4に抗原別及び疾患別の陽性率を示した。AIHで86%と高陽性、C型肝炎で27%と比較的高陽性を示した。一方、B型肝炎は12%で健常人と有意差はなかった。このことより、肝炎においてはB型肝炎は除外診断が可能なこと、抗HMG-1/2抗体陽性ではAIHである可能性が高いことが明らかになった。

また、抗核抗体との比較では、AIHとC型肝炎において抗HMG1/2抗体陽性率が抗核抗体陽性率より高かった。このことよりAIHとC型肝炎では抗核抗体より感度良く疾患を診断できることが明らかとなった。

15

表4

疾患名	n	陽性数 (%)		
		HMG-1	HMG-2	HMG-1 + HMG-2
自己免疫性肝炎	29	23 (79)	24 (83)	25 (86)
B型肝炎	26	2 (8)	2 (8)	3 (12)
C型肝炎	30	8 (27)	7 (23)	8 (27)
健常人	31	0 (0)	0 (0)	0 (0)

20

(実施例16) 各疾患における抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定

このELISA系を用いて自己免疫疾患および炎症性疾患患者の抗体を測定した。

25

用いた疾患は以下の通りである。慢性関節リウマチ50人、全身性エリテマトーデス47人、シェーグレン症候群12人、ベーチェット病32人、多発性筋炎/皮膚筋炎1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENT TRANSMITTED

Date of mailing (day/month/year)

18 March 1999 (18.03.99)

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.

PCT/JP97/01647

International filing date (day/month/year)

15 May 1997 (15.05.97)

Applicant

KANEKA CORPORATION et al.

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 22 January 1998 (22.01.98)	
International application No.: PCT/JP97/01647	Applicant's or agent's file reference: KA016PCT
International filing date: 15 May 1997 (15.05.97)	Priority date: 17 July 1996 (17.07.96)
Applicant: OZAKI, Shoichi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
17 December 1997 (17.12.97)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference KA016PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP97/01647	International filing date (day/month/year) 15 May 1997 (15.05.1997)	Priority date (day/month/year) 17 July 1996 (17.07.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/564		
Applicant KANEKA CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 December 1997 (17.12.1997)	Date of completion of this report 23 September 1998 (23.09.1998)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/01647

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-32,34-52, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages 33, filed with the letter of 25 February 1998 (25.02.1998),  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the claims, Nos. 1-9, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig 1-15, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_  
 the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
 the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/01647

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;  
citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims	-	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims	-	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims	-	NO

## 2. Citations and explanations

Claims 1-9

Document 1 [Arthritis & Rheumatism 37 (1) 1994, pp.98-103] discloses an immunoanalysis using HMG-1 and HMG-2 but not an immunodiagnostic drug using HMG-1 and HMG-2 which identifies that the autoimmune disease concerned is not an ulcerative colitis when the polypeptide is a neutrophil 28kDa antigen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Table 4 shows the percentages of positive patients by antigen and by disease. The percentage was as high as 86% among the AIH patients and 27% for the hepatitis C patients. The percentage among the hepatitis B patients was 12%, which was not significantly different from the percentage among the healthy persons. Based on these results, it was found that diagnosis by exclusion is possible regarding hepatitis B and that the anti-HMG-1/2 antibody-positive patients have a high possibility of having AIH.

Among the AIH and hepatitis C patients, the percentage of anti-HMG-1/2 antibody-positive patients was higher than the antinuclear antibody-positive patients. Based on these results, it was found that AIH and hepatitis C can be diagnosed at a higher sensitivity with the anti-HMG-1/2 antibody than with the antinuclear antibody.

20

Table 4

Disease	n	Percentage of positive patients (%)		
		HMG-1	HMG-2	HMG-1+HMG-2
Autoimmune hepatitis	29	23 (79)	24 (83)	25 (86)
Hepatitis C	26	2 (8)	2 (8)	3 (12)
Hepatitis B	30	8 (27)	7 (23)	8 (27)
Healthy persons	31	0 (0)	0 (0)	0 (0)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**AMENDMENTS**

(Amendments under Law Concerning International Applications, Etc. Pursuant to the Patent Cooperation Treaty, Sec. 11)

5

To: Commissioner of the Patent Office

1. Identification of International Application  
PCT/JP97/01647

10

2. Applicant

Name: KANEKA CORPORATION

Address: 2-4, Nakanoshima 3-chome, Kita-ku, Osaka-shi  
Osaka 530 Japan

15

Country of nationality: Japan

Country of residence: Japan

3. Agent

Name: 7828 YAMAMOTO Shusaku, Patent Attorney

20

Address: Fifteenth Floor, Crystal Tower,  
2-27, Shiromi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,  
Osaka 540 Japan

4. Item to be Amended

25

Specification

5. Subject Matter of the Amendments

As per the attached sheets.

30

In Table 4, page 33 of the specification (English specification, page 49), first column (disease), second disease "Hepatitis C" is amended to "Hepatitis B"; and third disease "Hepatitis B" is amended to "Hepatitis C".

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**6. List of Attached Documents**  
**Specification, substitute page 33**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Attachment 1

**APPLICANT(S) FOR DO/EO/US**

OZAKI, Shoichi; SOBAJIMA, Junko; UESUGI, Hiroko; OKAZAKI, Takahiro; TANAKA, Masao;  
NAKAO, Kazuwa; YOSHIDA, Michiteru; SHIRAKAWA, Hitoshi; OSAKADA, Fumio

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**